

# Modeliranje nekovalentnih interakcija u procesima solvatacije kvercetina i reorganizacije konformacije fragmenta U6 snRNA

---

Mihaljević, Frano

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:460350>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom](#).

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-23**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Frano Mihaljević**

**Modeliranje nekovalentnih interakcija u  
procesima solvatacije kvercetina i reorganizacije  
konformacije fragmenta U6 snRNA**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2019.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Fizikalna kemija 2 Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za fizikalnu kemiju pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Viktora Pilepića.

*Zahvaljujem svom mentoru izv. prof. dr. sc. Viktoru Pilepiću na uloženom trudu, stručnom vodstvu i pruženoj pomoći u izradi ovog rada, Sveučilišnom računalnom centru Sveučilišta u Zagrebu i Ani, čija mi podrška puno znači.*

# Sadržaj

<b>1</b>	<b>Uvod</b>	<b>1</b>
1.1	Nekovalentne interakcije . . . . .	1
1.2	Modeliranje nekovalentnih interakcija . . . . .	2
1.3	Modeliranje nekovalentnih interakcija molekula i fluktuirajuće okoline . . . . .	4
1.4	Kvercetin . . . . .	5
1.5	U6 RNA . . . . .	6
<b>2</b>	<b>Obrazloženje teme</b>	<b>9</b>
<b>3</b>	<b>Materijali i metode</b>	<b>10</b>
3.1	Materijali . . . . .	10
3.2	Metode . . . . .	10
3.2.1	Molekulska dinamika i analiza nekovalentnih interakcija solvatacije kvercetina . . . . .	10
3.2.2	Molekulska dinamika i analiza nekovalentnih interakcija u procesu reorganizacije konformacije fragmenta U6 RNA . . . . .	11
<b>4</b>	<b>Rezultati i rasprava</b>	<b>14</b>
<b>5</b>	<b>Zaključci</b>	<b>27</b>
<b>6</b>	<b>Literatura</b>	<b>28</b>
<b>7</b>	<b>Sažetak/Summary</b>	<b>33</b>
7.1	Sažetak . . . . .	33
7.2	Summary . . . . .	34
<b>8</b>	<b>Temeljna dokumentacijska kartica/Basic documentation card</b>	

# 1 Uvod

## 1.1 Nekovalentne interakcije

Povijesna usredotočenost kemije na kovalentne veze, usmjerenost istraživanja na mehanizam načina formiranja i pucanja kovalentnih veza, dovela je do toga da danas možemo s velikom preciznošću računalno okarakterizirati te procese (Riley i Hobza, 2011). S druge strane, važnost nekovalentnih interakcija, interakcija jedan do dva reda veličine slabijih od kovalentnih, preopoznata je tek posljednjih nekoliko desetljeća (Müller-Dethlefs i Hobza, 2000). Važnost nekovalentnih interakcija posebno je velika u biokemiji. Nekovalentne interakcije odgovorne su za sklapanje brojnih bioloških struktura. Za oblikovanje trodimenzionalne strukture biopolimera, poput nukleinskih kiselina, proteina i staničnih membrana, najvažnije su vodikove veze i hidrofobne interakcije. Osim toga, do nastajanja bioloških kompleksa, kakvi su oni između enzima i supstrata, antigena i protutijela, lijekova i receptora, dolazi zahvaljujući međusobnim interakcijama funkcionalnih skupina molekula. Tako, primjerice, indinavir, lijek koji se koristi u liječenju infekcija virusom humane imunodeficijencije (HIV), ostvaruje svoj učinak inhibicijom HIV proteaze, enzima koji prerađuje virusni genetski materijal. Indinavir inhibira ovaj enzim tako da hidroksilna skupina u središtu molekule indinavira zamjenjuje molekulu vode, koja je nukleofil u hidrolizi supstrata, u aktivnom mjestu enzima. Osim toga, ugljikov atom na kojem se ta skupina nalazi ima strukturu nalik strukturi prijelaznog stanja u reakciji hidrolize peptida što omogućuje stvaranje istih vodikovih veza, ali, za razliku od prijelaznog stanja, molekula indinavira nije podložna cijepanju tim enzimom. Kompleks indinavira i enzima učvršćen je i vodikovim vezama između karbonilnih skupina lijeka, molekule vode i amino skupina enzima (Atkins i de Julio, 2011).

Nekovalentne interakcije su interakcije dalekog dometa. Postoje i na udaljenostima do 10 Å, za razliku od kovalentnih interakcija čiji je domet oko 2 Å (Černý i Hobza, 2007). Na tako velikim udaljenostima od atoma dominiraju tri vrste efekata: elektrostatika, indukcija i disperzija. Elektrostatski efekt najjednostavniji je od njih i opisuje klasične interakcije između distribucija statičkih naboja dviju molekula. Može biti i privlačan i odbojan, za razliku od induktivnog efekta koji je isključivo privlačan. Induktivni efekt proizlazi iz deformacije molekule pod djelovanjem električnog polja susjednih molekula. Disperzijski efekt proizlazi iz kretanja elektrona. Kretanjem elektrona mijenja se distribucija naboja u molekuli. Približavanjem dvije molekule dolazi do korelacije u kretanju elektrona u molekulama pri čemu konfiguracije niže energije

postaju favorizirane. Korelacijski efekt postaje sve jači što su molekule bliže pa je disperzijska energija privlačna (Stone, 2017). Disperzijska energija može biti značajno velika, posebno kod interakcija aromatskih sustava s delokaliziranim elektronima (Müller-Dethlefs i Hobza, 2000). Odbojne sile između molekula na kratkim udaljenostima posljedica su i potrebe prilagodbe valnih funkcija zbog održavanja Paulijevog principa – dva elektrona ne mogu okupirati isto kvantno stanje unutar istog kvantnog sustava. Za prilagodbu valnih funkcija potrebna je energija (Stone, 2017).

Priroda nekovalentnih interakcija može biti stabilizirajuća, destabilizirajuća ili se može raditi o delokaliziranim slabim interakcijama. Stabilizirajuće interakcije prevladavaju kada privlačne sile između atoma koji sudjeluju balansiraju odbojne sile. Primjer stabilizirajućih interakcija su vodikove veze. S druge strane, kada odbojne sile nisu u dovoljnoj mjeri izbalansirane privlačnim silama, javljaju se destabilizirajuće interakcije, poput steričkog zagušenja ili interakcija unutar zatvorenog prstena. Primjerice, kod molekule benzena javljaju se odbojne sile između atoma kao posljedica prstenaste strukture koju stvaraju kovalentne interakcije. Delokalizirane slabe interakcije, poput van der Waalsovih interakcija, posljedica su sudjelovanja većeg broja atoma među kojima vladaju slabe privlačne sile (Chaudret i sur., 2014).

## 1.2 Modeliranje nekovalentnih interakcija

Elektronska gustoća je vjerojatnost nalaženja elektrona u prostoru oko atomskih jezgri ( $\rho(r)$ ). Može se dobiti eksperimentalno rendgenskom difrakcijskom analizom te pomoću kvantno mehaničkih izračuna, npr. iz valnih funkcija molekulskih orbitala ili kao promolekulska gustoća dobivena iz sume aproksimiranih elektronskih gustoća atoma (Atkins i de Julio, 2010; Contreras-García i sur., 2011).

$$\rho(r) = \sum_m |\psi_m(r)|^2$$

$$\rho^{pro} = \sum_i \rho_i^{at}$$

$$\rho^{at} = \sum_j c_j e^{-r/\xi_j}$$

Analizom  $\rho(r)$  moguće je modelirati nekovalentne interakcije na više načina. Jedan od načina je pomoću izračuna reduciranog gradijenta gustoće ( $s(r)$ ).  $s(r)$  je funkcional elektronske

gustoće i dobiva se iz gustoće i njene prve derivacije:

$$s = \frac{1}{2(3\pi^2)^{1/3}} \frac{|\nabla\rho(r)|}{\rho(r)^{4/3}}$$

Reducirani gradijent gustoće bezdimenzijska je veličina koja pokazuje odstupanje od homogene distribucije elektrona. U područjima koja se nalaze daleko od molekule elektronska gustoća teži prema nuli, a reducirani gradijent gustoće poprimat će vrlo velike pozitivne vrijednosti. Nasuprot tome, u područjima kovalentnih i nekovalentnih interakcija reducirani gradijent gustoće poprima niske vrijednosti, odnosno teži nuli.

Na grafu ovisnosti reduciranog gradijenta gustoće i elektronske gustoće nekovalentne interakcije mogu se razlikovati od područja sa sličnom elektronskom gustoćom po tome što kod nekovalentnih interakcija u kritičnoj točki gradijent elektronske gustoće iznosi 0 pa je zbog toga i reducirani gradijent jednak 0. Dodatno, nekovalentne interakcije mogu se dodatno okarakterizirati pomoću predznaka druge svojstvene vrijednosti u Hessovoj matrici elektronske gustoće ( $\lambda_2$ ).

$$\nabla^2\rho = \lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3 (\lambda_1 \leq \lambda_2 \leq \lambda_3)$$

Kada je vrijednost  $\lambda_2$  negativna, radi se o privlačnim interakcijama, a kada je ona pozitivna o neveznim, odnosno odbijajućim interakcijama, kao što je npr. steričko odbijanje (Johnson i sur., 2010).

Sve navedeno omogućuje vizualizaciju nekovalentnih interakcija u trodimenzionalnom prostoru. Konstrukcijom kvadra oko sustava u kojem se želi analizirati nekovalentne interakcije i podjelom tog prostora na pravilno razmaknute točke, uz poznate koordinate atoma, u svakoj od točaka može se izračunati promolekulska elektronska gustoća.

Računalnom analizom promolekulskih gustoća dobivaju se vrijednosti  $s(r)$  i  $\lambda_2$ . Na temelju vrijednosti  $s(r)$  i  $\rho(r)$  mogu se prikazati izokonturne plohe za određenu vrijednost  $s(r)$ , pri čemu su plohe obojene ovisno o vrijednosti umnoška predznaka  $\lambda_2$  i elektronske gustoće. Bitno je odrediti vrijednost elektronske gustoće iznad koje se izokonturne plohe neće prikazati jer bi predstavljale kovalentne interakcije (Contreras-García i sur., 2011).

Analiza nekovalentnih interakcija pomoću reduciranog gradijenta gustoće pokazala se uspješnom kod biokemijskih sustava poput kompleksa histona i deoksiribonukleinske kiselina (González i sur., 2016), kiralnih kompleksa (Chaudret i sur., 2014), kao i za istraživanje interakcija u kristalima (Otero-de-la-Roza i sur., 2014) i polimorfima kristala (Fabijanić i sur., 2017a,b).

### 1.3 Modeliranje nekovalentnih interakcija molekula i fluktuirajuće okoline

Moguće je modificirati prethodno navedenu metodu kako bi ona bila primjenjiva i na molekule čija se okolina mijenja, odnosno kod kojih dolazi do fluktuacije okolnih molekula. Wu i suradnici predložili su dvije mogućnosti izračunavanja prosječnog reduciranog gradijenta elektronske gustoće pomoću kojeg se može analizirati ovaj tip sustava:

$$\overline{s(r)} = \frac{1}{2(3\pi^2)^{1/3}} \frac{|\overline{\nabla\rho(r)}|}{\overline{\rho(r)}^{4/3}} \quad (1)$$

$$\langle s(r) \rangle = \sum_{n=1}^N \frac{s_i(r)}{N} \quad (2)$$
$$s_i(r) = \frac{1}{2(3\pi^2)^{1/3}} \frac{|\nabla\rho_i(r)|}{\rho_i(r)^{4/3}}$$

Metoda se provodi tako da se pomoću molekulske dinamike dobije niz struktura u vremenu te se za svaku od dobivenih struktura izračuna  $\rho(r)$  i  $s(r)$ . Iz dobivenih podataka se na jedan od ova dva načina izračunaju njihove srednje vrijednosti. Način 1 pokazao se boljim, odnosno način 2 lošijim iz razloga što takvim načinom računanja određene mikroskopske interakcije bivaju izostavljene iz rezultata. Da bi se ovim načinima dobila smisljena vizualizacija, potrebno je podijeliti sustav na podsustav (područje sustava oko kojeg želimo vidjeti nekovalentne interakcije) i okolinu, odnosno potrebno je fiksirati koordinate podsustava.

Osim pomoću prosječnog reduciranog gradijenta elektronske gustoće, nekovalentne interakcije u fluktuirajućem sustavu možemo okarakterizirati i indeksom termalne fluktuacije ( $f(r)$ ):

$$f(r) = \frac{\sigma(\rho_i(r))}{\rho_i(r)}$$

Indeks termalne fluktuacije govori o stabilnosti nekovalentne interakcije, odnosno utjecaju termalnih gibanja na interakciju. Manje vrijednosti indeksa upućuju na interakcije na koje termalna gibanja imaju malen utjecaj, dok velike vrijednosti upućuju na fleksibilne interakcije koje su često prekidane termalnim gibanjima (Wu i sur., 2013).

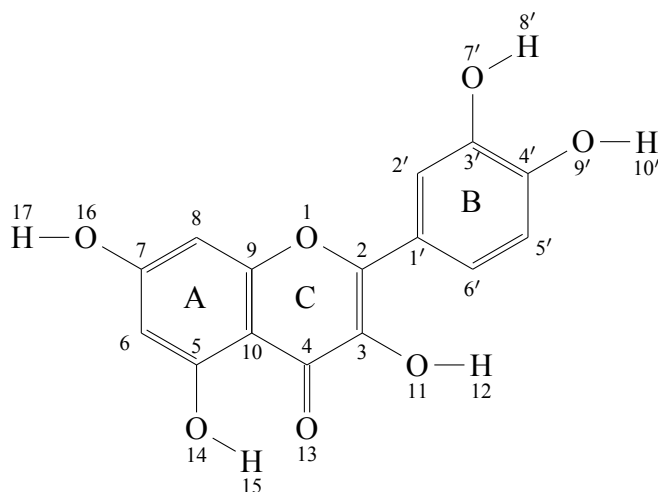
U ovom radu analizirane su nekovalentne interakcije u procesima solvatacije kvercetina i njegovih aniona te reorganizacije konformacije fragmenta U6 male jezgrene RNA (snRNA).



## 1.4 Kvercetin

Flavonoidi su polifenolni spojevi male molekularne mase. Oni su sekundarni biljni metaboliti i kao takvi nalaze se u voću, povrću, stabljikama, sjemenkama, plodovima i cvjetovima, ali i začinima, čajevima i crnom vinu (Romano i sur., 2013). S flavonoidima se povezuju određeni kardioprotektivni učinci, kao posljedica njihovog antioksidativnog djelovanja (Heim i sur., 2002). Pokazano je, primjerice, da povećani unos flavonoida smanjuje rizik od koronarne bolesti srca i infarkta miokarda (Hertog i sur., 1993). Flavonoidima je zajednička flavanska jezgra, struktura sastavljena od 15 ugljikovih atoma raspoređenih u dva aromatska prstena (A i B) koje dijeli heterociklički piranski prsten (C). Ovisno o stupnju oksidacije heterocikličkog prstena i ugljikovom atomu na kojeg je vezan B prsten, flavonoide možemo podijeliti na skupine: flavoni, flavonoli, flavanoni, flavanonoli, flavanoli (katehini), antocijanini i kalkoni. Unutar svake skupine pojedini se flavonoidi razlikuju po supstituentima na ugljikovim atomima A i B prstena (Panche i sur., 2016).

Kvercetin (slika 1) je flavonol koji posjeduje antioksidativna, protuupalna, protubakterijska, protuviralna, protukarcinomska i kardioprotektivna svojstva (Wang i sur., 2016). Pri fiziološkom pH (7.4), 4'-OH i 7-OH skupine kvercetina, kao i ostalih flavonoida, mogu egzistirati i u protoniranom i deprotoniranom obliku što može utjecati na njegov mehanizam antioksidativnog djelovanja (Lemańska i sur., 2001).



Slika 1: Kemijska struktura kvercetina s numeriranim atomima i označenim prstenovima.

Predloženi reakcijski mehanizmi kojima bi flavonoidi mogli djelovati antioksidativno prema reaktivnim kisikovim radikalima (ROS) uključuju prijenos vodikovog atoma (eng. *hydrogen atom transfer*, HAT), istovremen prijenos protona i elektrona (eng. *proton-coupled electron*

Tablica 1: Reakcijske sheme mogućih mehanizama antioksidativnog djelovanja flavonoida - razlika između HAT i PCET mehanizama je što se u PCET reakciji proton i elektron prenose kao odvojene čestice različitim setovima orbitala, a ne kao vodikov atom

Mehanizam	Reakcijska shema
HAT	$A(OH)_n + R-O\bullet \longrightarrow A(OH)_{n-1}-O\bullet + R-OH$
PCET	$A(OH)_n + R-O\bullet \longrightarrow A(OH)_{n-1}-O\bullet + R-OH$
SPLET	$A(OH)_n \longrightarrow A(OH)_{n-1}-O^- + H^+$ $A(OH)_{n-1}-O^- + R-O\bullet \longrightarrow A(OH)_{n-1}-O\bullet + R-O^-$
SET	$A(OH)_n + R-O\bullet \longrightarrow A(OH)_{n-1}-O^{\bullet+} + R-O^-$
SEPT	$A(OH)_n + R-O\bullet \longrightarrow A(OH)_{n-1}-OH^{\bullet+} + R-O^-$ $A(OH)_{n-1}-OH^{\bullet+} \longrightarrow A(OH)_{n-1}-O\bullet + H^+$
SPLHAT	$A(OH)_n \longrightarrow A(OH)_{n-1}-O^- + H^+$ $A(OH)_{n-1}-O^- + R-O\bullet \longrightarrow A(OH)_{n-2}-(O\bullet)-O^- + R-OH$

*transfer*, PCET), postupni prijenos protona pa elektrona (eng. *sequential proton-loss electron transfer*, SPLET), prijenos samog elektrona (eng. *single electron transfer*, SET), postupni prijenos elektrona pa protona (eng. *sequential electron proton transfer*, SEPT) i postupni gubitak protona i prijenos vodikovog atoma (eng. *sequential proton-loss hydrogen-atom transfer*, SPLHAT). Reakcijske sheme ovih mogućih mehanizama dane su u tablici 1 (Galano i sur., 2016).

Reakcijski mehanizam antioksidativne reakcije, između ostalog, ovisi i o načinu solvatacije, odnosno dostupnosti pojedinih reaktivnih centara na kvercetin u te je u ovom radu provedeno istraživanje nekovalentnih interakcija između kvercetina i odgovarajućih 4'-OH i 7-OH aniona s okolnim molekulama vode koristeći računalni model u kojem je kvercetin uklopljen u okolinu koja se sastoji od fluktuirajućih molekula vode u periodičkim uvjetima.

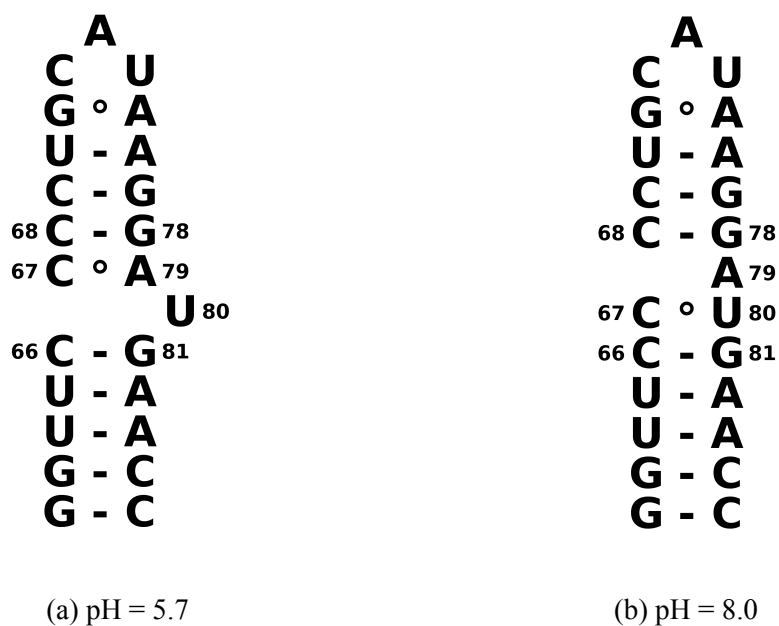
## 1.5 U6 RNA

U6 RNA mala je jezgrena ribonukleinska kiselina koja čini dio velikog ribonukleoproteinskog kompleksa (engl. *spliceosome*) čija je svrha izrezivanje introna u procesu sazrijevanja mRNA (Brow, 2002). U6 je evolucijski najočuvanija ribonukleinska sastavnica tog kompleksa, što upućuje na njenu veliku važnost u njegovom djelovanju. Štoviše, među vrstama postoje vrlo mala odudaranja od njene duljine, što vjerojatno znači da odstupanja nisu moguća iz steričkih

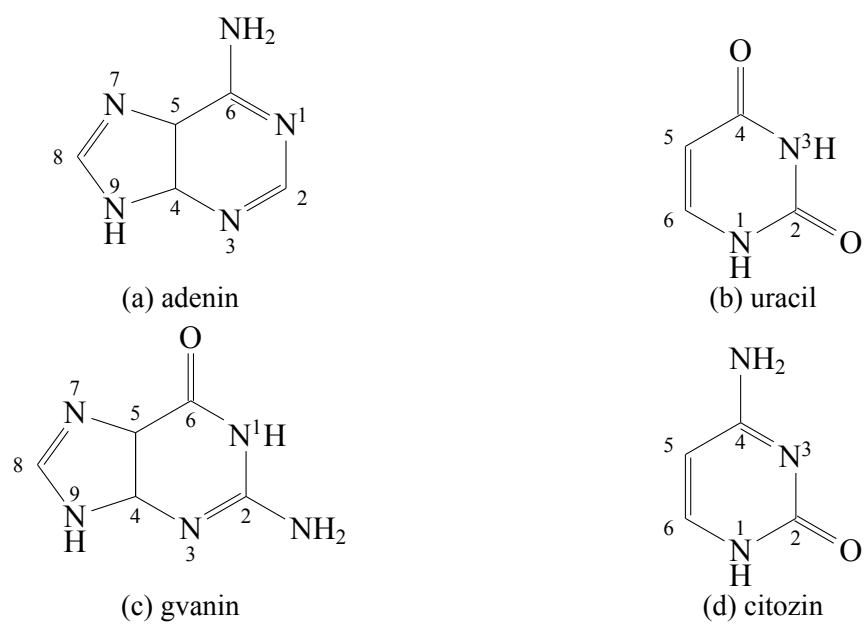
razloga, odnosno da je U6 u interakciji s mnogim drugim dijelovima kompleksa (Brow i Guthrie, 1988).

Katalitičku jezgru kompleksa čine sparene ribonukleinske kiseline U2 i U6. Pri njihovom sparivanju, na U6 se formira intramolekularna petlja (eng. *intramolecular stem-loop*, ISL) (Brow, 2002). NMR ispitivanjima tog fragmenta U6 otkriveno je da se uracil na poziciji 80, pri različitim pH, nalazi u različitim konformacijama. Pri pH od 5.7 on je okrenut prema van, dok je na pH 7.0 i 8.0 okrenut prema unutrašnjosti fragmenta (Reiter i sur., 2004). Okretanje ove baze moglo bi biti važno za funkciju cijelog kompleksa za izrezivanje baza. Naime, otkriveno je da je mutacija uracila na poziciji 80 u gvanin letalna kod kvasca. Ona dovodi do stabilizacije strukture i onemogućava okret baze (Sashital i sur., 2003).

U procesu promjene konformacije koja je važna za biološku funkciju U6 fragmenta ključnu ulogu ima reorganizacija nekovalentnih veza između baza. U ovom radu istraživane su nekovalentne interakcije između baza te između baza i otapala (vode) koje dovode do stabilizacije i procesa promjene konformacije koristeći računalni model fragmenta U6 uklopljenog u kvadar koji se sastoji od molekula vode i natrijevih iona u periodičkim uvjetima.



Slika 2: Shematski prikaz fragmenta U6 pri različitim pH (znakom  $\circ$  označeni su ne-Watson-Crickovi parovi baza).



Slika 3: Numeracija atoma u pojedinim bazama RNA

## 2 **Obrazloženje teme**

Nekovalentne interakcije imaju važnu ulogu u brojnim kemijskim i biokemijskim procesima. Struktura i funkcija biomolekula kao što su proteini i nukleinske kiseline u velikoj su mjeri određene nekovalentnim interakcijama unutar i između biomolekula, kao i s okolnim otapalom i ionima. Biokemijski procesi vrlo često uključuju promjene konformacije biomolekula pri čemu ključnu ulogu imaju nekovalentne interakcije. Obzirom da je detaljno eksperimentalno istraživanje složenih bioloških sustava i procesa na molekulskoj razini vrlo teško, pretpostavka temeljena na dosadašnjim istraživanjima biokemijskih procesa je da se računalnom analizom nekovalentnih interakcija tijekom nekog procesa na primjeru odgovarajućeg prikladnog modela može doći do boljeg poznavanja toga procesa.

Svrha ovog diplomskog rada je utvrditi mogućnosti računalnog modeliranja nekovalentnih interakcija u istraživanju jednostavnih i složenijih biokemijskih procesa.

U tu svrhu, cilj ovog rada je provesti detaljno računalno modeliranje nekovalentnih interakcija na dva modela različitih biokemijski i biomedicinski važnih sustava: sustavu kvercetina i odgovarajućih aniona u vodi te fragmenta U6 snRNA u vodi, pri čemu bi se dobiveni rezultati mogli dovesti u vezu s procesom prijenosa elektrona i protona u antioksidativnoj reakciji te procesom promjene konformacije biomolekule.

U izradi ovog rada korištene su kvantno mehaničke i molekularno mehaničke računske metode.

## 3 Materijali i metode

### 3.1 Materijali

U ovom diplomskom radu korišteni su sljedeći programi postavljeni na odgovarajuće opremljenom lokalnom računalu i računalnom čvoru Isabella Sveučilišnog računskog centra Sveučilišta u Zagrebu (SRCE):

- Amber 2018,
- AmberTools 18,
- CP2K,
- CRITIC2,
- MultiWFN,
- NAMD,
- VMD.

### 3.2 Metode

#### 3.2.1 Molekulska dinamika i analiza nekovalentnih interakcija solvatacije kvercetina

Koordinate atoma molekula i iona kvercetina korištene za račun molekulske dinamike dobivene su geometrijskom optimizacijom kao koordinate atoma konformera najniže energije. Za svaku od 4 molekule kvercetina i njegovih iona (4'-OH anion, 7-OH anion i 4'-OH, 7-OH dianion) generirani su naboji RESP metodom (Bayly i sur., 1993; Wang i sur., 2004), sastavnog dijela Amber18 paketa (Case i sur., 2018). Korištena je verzija programa pmemd optimizirana za rad na grafičkoj kartici (Götz i sur., 2012; Le Grand i sur., 2013; Salomon-Ferrer i sur., 2013). Potom su napravljene modifikacije polja sila koje se ne nalaze u općem Amberovom polju sila (GAFF) (Wang i sur., 2000). Sve molekule uklopljene su u kvadar sastavljen od molekula vode opisanih TIP3P poljem sila (Price i Brooks, 2004) koji se proteže najmanje 15 Å od koordinata atoma u molekulama te je u sustave s ionima uklopljen odgovarajući broj oksonijevih iona kako bi sustav bio neutralan (Baaden i sur., 2001).

Geometrijska optimizacija svakog sustava provedena je u 500 koraka metodom najstrmijeg spusta i 500 koraka metodom konjugiranog gradijenta. Sustavi su postepeno zagrijavani tijekom 20 ps s 0.0 na 310.0 K. Simulacija molekulske dinamike provedena je u periodičkim graničnim uvjetima pri konstantnoj temperaturi (310 K) i konstantnom tlaku (1 bar). Relaksacijsko vrijeme

tlaka postavljeno je na 2.0 ps (Berendsen i sur., 1984), a temperatura je kontrolirana Langevinovim termostatom s frekvencijom sudara od  $1.0 \text{ ps}^{-1}$  (Pastor i sur., 1988). Kovalentne veze vodikovih atoma u sustavu ograničene su SHAKE algoritmom (Ryckaert i sur., 1977). Za izračun udaljenih interakcija korištena je PME metoda (Darden i sur., 1993). Vrijeme između dva koraka bilo je 2 fs, a koordinate su bilježene u razmacima od 1 ps. Ukupno trajanje simulacije bilo je 20 ns.

Za svaku od 2000 struktura dobivenih prethodno provedenim računom molekulske dinamike izračunata je promolekularna elektronska gustoća. Iz dobivenih podataka, i izračunatog prosjeka elektronske gustoće ( $\overline{\rho(r)}$ ) i prosjeka gradijenta gustoće ( $\overline{\nabla\rho(r)}$ ), izračunat je prosječni reducirani gradijent elektronske gustoće ( $s(r)$ ) (Wu i sur., 2013), prema formuli:

$$s(r) = \frac{1}{2(3\pi^2)^{1/3}} \frac{|\overline{\nabla\rho(r)}|}{\overline{\rho(r)}^{4/3}}$$

Prosječni reducirani gradijent elektronske gustoće izračunat je za svaku točku koordinatne mreže veličine  $200 \cdot 140 \cdot 80$  točaka koja se protezala na udaljenosti 20 Bohrovih radijusa ( $a_0$ ) u oba smjera  $x$ -osi, 12  $a_0$  u oba smjera  $y$ -osi i 8  $a_0$  u oba smjera  $z$ -osi od točke koja je polovište dužine koja spaja jezgre atoma ugljika na poziciji 5 i atoma vodika vezanog za ugljik na poziciji 2'. Navedeni računi provedeni su pomoću programa Multiwfn 3.6 (Lu i Chen, 2012). Rezultat je vizualiziran programom Visual Molecular Dynamics (VMD) (Humphrey i sur., 1996) tako da su prethodno sakrivene molekulske interakcije koje su udaljene više od 1.5 van der Waalsovih radijusa svakog pojedinog atoma molekule kvercetina. Grafovi ovisnosti prosječnog reduciranog gradijenta o elektronskoj gustoći prikazani su pomoću matplotlib Python knjižnice (Hunter, 2007).

### 3.2.2 Molekulska dinamika i analiza nekovalentnih interakcija u procesu reorganizacije konformacije fragmenta U6 RNA

Početne strukture fragmenata U6 preuzete su iz proteinske baze podataka (PDB) pod kodovima 2KEZ (Venditti i sur., 2009) i 1SYZ (Reiter i sur., 2004). Račun molekulske dinamike cijelih struktura proveden je pomoću programa NAMD (Phillips i sur., 2005) s CHARMM36 (Vanommeslaeghe i sur., 2010) poljem sila. Petlje su postavljene u kvadar ispunjen TIP3P molekulama vode (Price i Brooks, 2004) koji se proteže najmanje  $10 \text{ \AA}$  od svakog od atoma RNA. Potom je dodan dovoljan broj natrijevih iona kako bi sustav bio neutralan. Provedena je geometrijska optimizacija u 1000 koraka i 10 ns molekulske dinamike s fiksiranim atomima fragmenta. Na

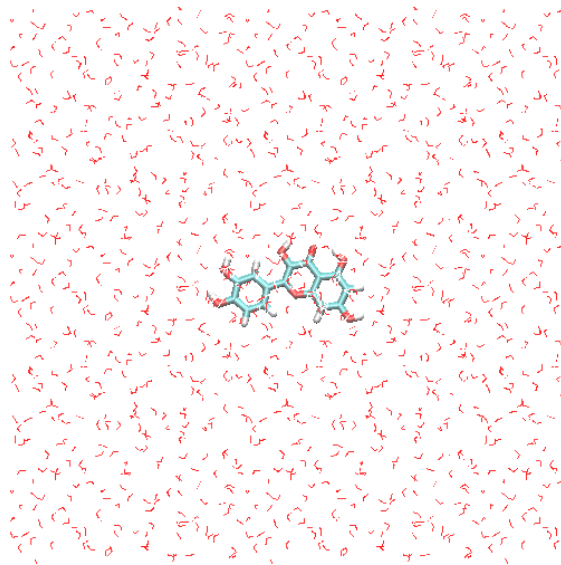
odabranim reprezentativnim strukturama dobivenim pomoću prehodno navedenog računa molekulske dinamike izračunata je elektronska gustoća pomoću CP2K programa koristeći funkcional PADE, pseudopotencijal GTH i TZVP-GTH i SZV-GTH bazne setove (Borštnik i sur., 2014; Frigo i Johnson, 2005; Goedecker i sur., 1996; Hartwigsen i sur., 1998; Hutter i sur., 2014; Krack, 2005; Lippert i sur., 1997; Schütt i sur., 2016; VandeVondele i Hutter, 2003; VandeVondele i sur., 2005). Analiza nekovalentnih interakcija iz dobivenih elektronskih gustoća provedena je programom CRITIC2 (Otero-de-la-Roza i sur., 2012) i vizualizirana programom VMD (Humphrey i sur., 1996).

Račun molekulske dinamike fluktuirajuće okoline uracila na poziciji 80, za strukturu 2KEZ u kojoj je uracil okrenut prema unutrašnjosti fragmenta i strukturu 1SYZ u kojoj je uracil okrenut prema otapalu proveden je pomoću programskog paketa Amber18 (Case i sur., 2018) s ff99bsc0 $\chi$ OL3 poljem sila (Zgarbová i sur., 2011). Korištena je verzija programa pmemd optimizirana za rad na grafičkoj kartici (Götz i sur., 2012; Le Grand i sur., 2013; Salomon-Ferrer i sur., 2013). Petlje su postavljene u kvadar ispunjen TIP3P molekulama vode (Price i Brooks, 2004) koji se proteže najmanje 15 Å od svakog od atoma RNA. Potom je dodan dovoljan broj natrijevih iona kako bi sustav bio neutralan. Geometrijska optimizacija cijelog sustava provedena je u 500 koraka metodom najstrmijeg spusta i 500 koraka metodom konjugiranog gradijenta. Sustav je potom postepeno zagrijavan tijekom 20 ps s 0.0 na 310.0 K. Simulacija molekulske dinamike provedena je u periodičkim graničnim uvjetima pri konstantnoj temperaturi (310 K) i konstantnom tlaku (1 bar). Relaksacijsko vrijeme tlaka postavljeno je na 2.0 ps (Berendsen i sur., 1984), a temperatura je kontrolirana Langevinovim termostatom s frekvencijom sudara od 1.0 ps<sup>-1</sup> (Pastor i sur., 1988). Veze vodikovih atoma ograničene su SHAKE algoritmom (Ryckaert i sur., 1977). Za izračun udaljenih interakcija korištena je PME metoda (Darden i sur., 1993). Vrijeme između dva koraka bilo je 2 fs, a koordinate su bilježene u razmacima od 1 ps. Ukupno trajanje simulacije bilo je 5 ns. Postupci geometrijske optimizacije, zagrijavanje i simulacije ponovljeni su, pri čemu je početno stanje sustava bilo završno stanje prethodne dinamičke simulacije, a atomi baze U80 fiksirani su harmonijskim potencijalom težine 500.0 kcal mol<sup>-1</sup> Å<sup>-2</sup>, a simulacija je trajala 20 ns. Datoteka s trajektorijama dobivena ponovljenom molekulskom dinamikom analizirana je pomoću programa MultiWFN (Lu i Chen, 2012). Prosječni reducirani gradijent elektronske gustoće izračunat je za svaku točku koordinatne mreže veličine 100 · 100 · 100 točaka koja se protezala 10 Bohrovih radijusa ( $a_0$ ) u svakom smjeru sve tri koordinatne osi od točke koja se nalazi u središtu pirimidinskog prstena U80.



Nakon toga, sakrivene su sve interakcije udaljene više od 1.5 van der Waalsovih radijusa svakog od atoma uracila na 80. poziciji. Grafovi ovisnosti prosječnog reduciranog gradijenta o elektronskoj gustoći prikazani su pomoću matplotlib Python knjižnice (Hunter, 2007).

## 4 Rezultati i rasprava



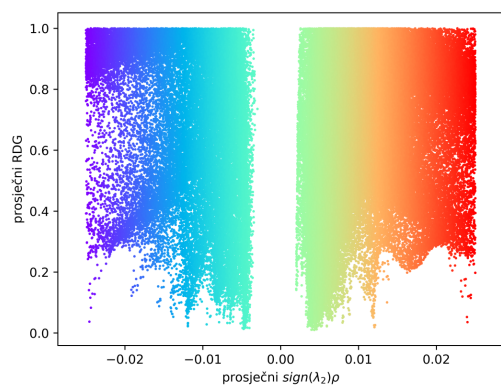
Slika 4: Model molekule kvercetina u kvadru ispunjenom molekulama otapala (vode)

U istraživanju nekovalentnih interakcija kod solvatacije, odnosno hidratacije kvercetina odabran je model kod kojeg su sve strukture prisutne na fiziološkom pH (neutralna molekula i odgovarajući 4'-OH i 7-OH anioni i dianion) u periodičkim uvjetima smještene u kvadar ispunjen molekulama vode. Primjer računalnog modela za kvercetin prikazan je na slici 4.

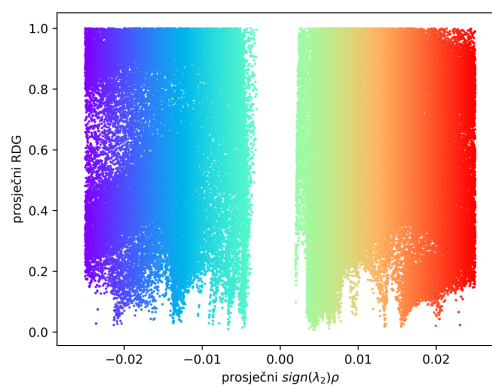
Kod analize nekovalentnih interakcija, minimumi na grafu ovisnosti  $\overline{s(r)}$  o  $\text{sign}(\lambda_2)\rho$  označavaju nekovalentne interakcije pri čemu vrijednost  $\rho$  označava jakost te interakcije (Johnson i sur., 2010). Boja točke na plavo-zelено-crvenoj skali označava jakost privlačnih i odbojnih interakcija. Tamnoplava područja mogu se pripisati snažnim privlačnim nekovalentnim interakcijama, npr. vodikovim vezama, zelena područja slabim privlačnim i odbojnim van der Waalsovima interakcijama, a crvena područja snažnim odbojnim nekovalentnim interakcijama, npr. steričkim smetnjama. Na slici 5 prikazane su ovisnosti  $\overline{s(r)}$  o  $\text{sign}(\lambda_2)\rho$  za nekovalentne interakcije strukture kvercetina s okolnim fluktuirajućim molekulama vode.

Iz slike 5 može se razaznati prisutnost intramolekulskih i intermolekulskih vodikovih veza i privlačnih i odbojnih disperznih i steričkih interakcija.

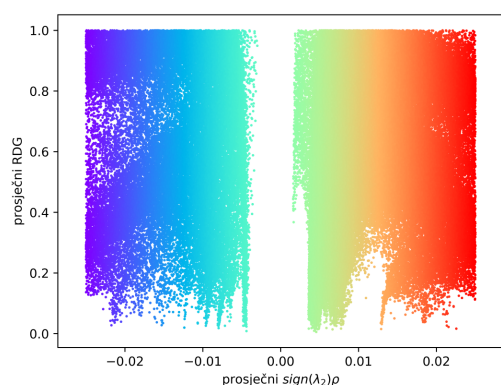
Iz izokonturnih ploha prikazanih na slici 6a vidljivo je da neutralna molekula kvercetina tvori vodikove veze sa svim svojim hidroksilnim skupinama, pri čemu su neke veze intramolekularne – one između O(13) i H(12), O(13) i H(15), H(10') i O(7'). Plavozelenim elipsama na slici su prikazane intermolekularne vodikove veze koje s okolnim fluktuirajućim molekulama vode



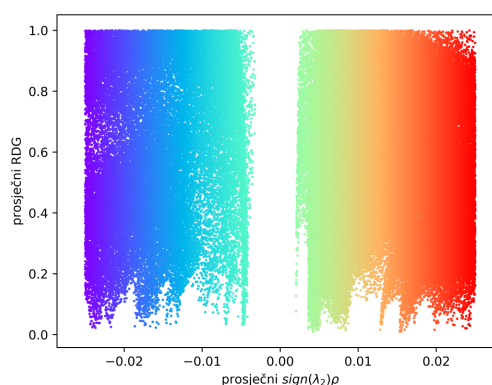
(a) Molekula kvercetina



(b) 4'-OH anion kvercetina



(c) 7-OH anion kvercetina



(d) 4'-OH i 7-OH dianion kvercetina

Slika 5: Prikazi ovisnosti  $\overline{s(r)}$  o  $\text{sign}(\lambda_2)\rho$  za modelne molekule kvercetina. Plavo-zeleno-crvena skala označava vrijednosti  $\text{sign}(\lambda_2)\rho$  u rasponu od  $-0.025$  do  $0.025$ .

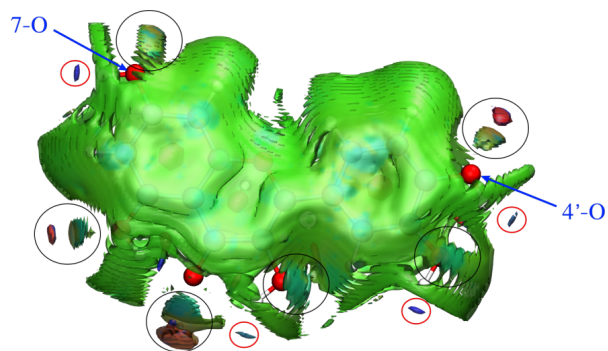
tvore atomi O(9'), H(10'), O(7'), H(8'), O(11), H(12), O(13), O(14), O(16) i H(17).

Primjetne su i slabe privlačne nekovalentne interakcije B prstena kvercetina s okolnim fluktuirajućim molekulama vode.

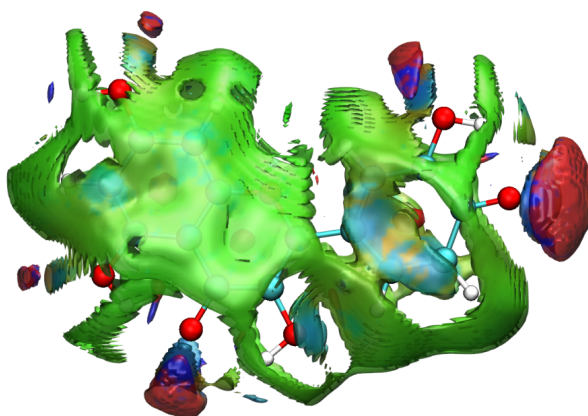
Tamnoplavo obojane izokonturne plohe na slici 6b otkrivaju da, deprotonacijom, kisik iz 4'-OH skupine tvori snažnije nekovalentne interakcije s okolnim fluktuirajućim molekulama vode.

Također, vidljivo je da su snažnije vodikove veze koje tvori karbonilni kisik i kisik iz 3'-OH skupine, kao i nekovalentne interakcije u blizini 1' i 5' ugljikovih atoma. Jačanje ovih interakcija, u odnosu na neutralnu molekulu, može se objasniti negativnim nabojem na molekuli.

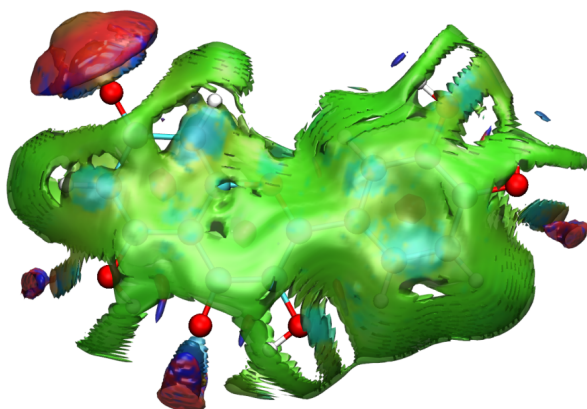
Slika 6c otkriva sličnu situaciju sa 7-OH anionom kvercetina. Dolazi do jačanja interakcija s  $\pi$  elektronima A i B prstena, kao i s karbonilnim kisikovim atomom.



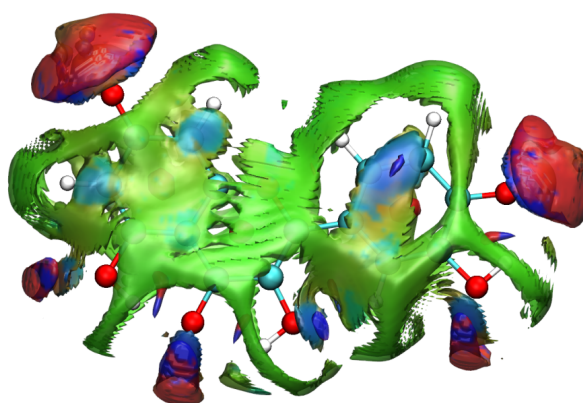
(a) Molekula kvercetina



(b) 4'-OH anion kvercetina

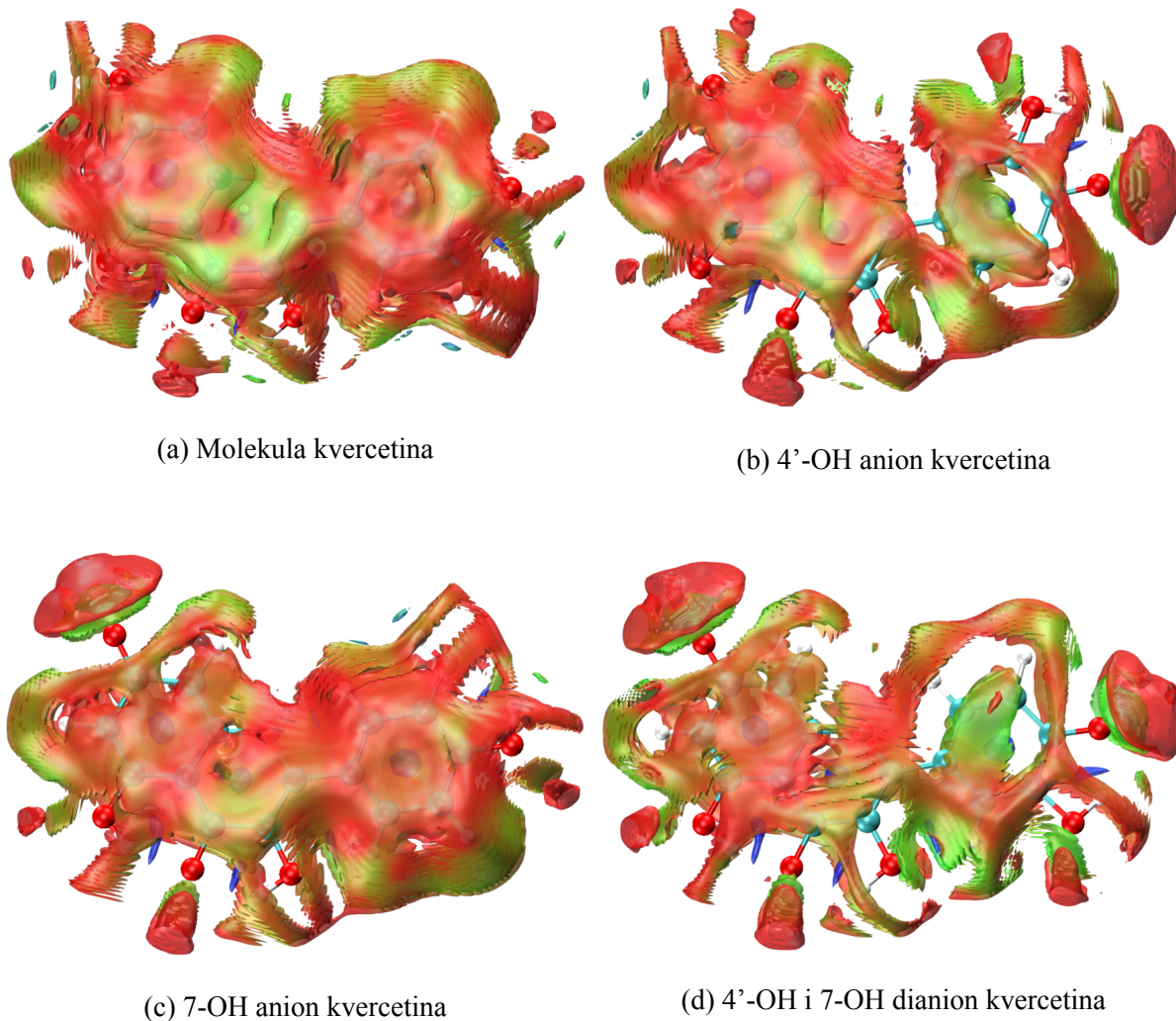


(c) 7-OH anion kvercetina



(d) 4'-OH i 7-OH dianion kvercetina

Slika 6: Izokonturne plohe ( $s = 0.3 a.u.$ ) za nekovalentne interakcije molekula i iona kvercetina s okolnim fluktuirajućim molekulama otapala (vode). Boje na plavo-zelено-crvenoj skali odgovaraju jakim privlačnim, slabim privlačnim i odbojnim te jakim odbojnim nekovalentnim interakcijama, ovisno o vrijednosti  $\text{sign}(\lambda_2)\rho$  između  $-0.025$  i  $0.025$ .



Slika 7: Izokonturne plohe ( $s = 0.3 \text{ a.u.}$ ) za nekovalentne interakcije molekula i iona kvercetina s okolnim fluktuirajućim molekulama otapala (vode). Boje na plavo-zeleno-crvenoj skali odgovaraju vrijednosti termalnog fluktuacijskog indeksa između 0.0 i 1.5.

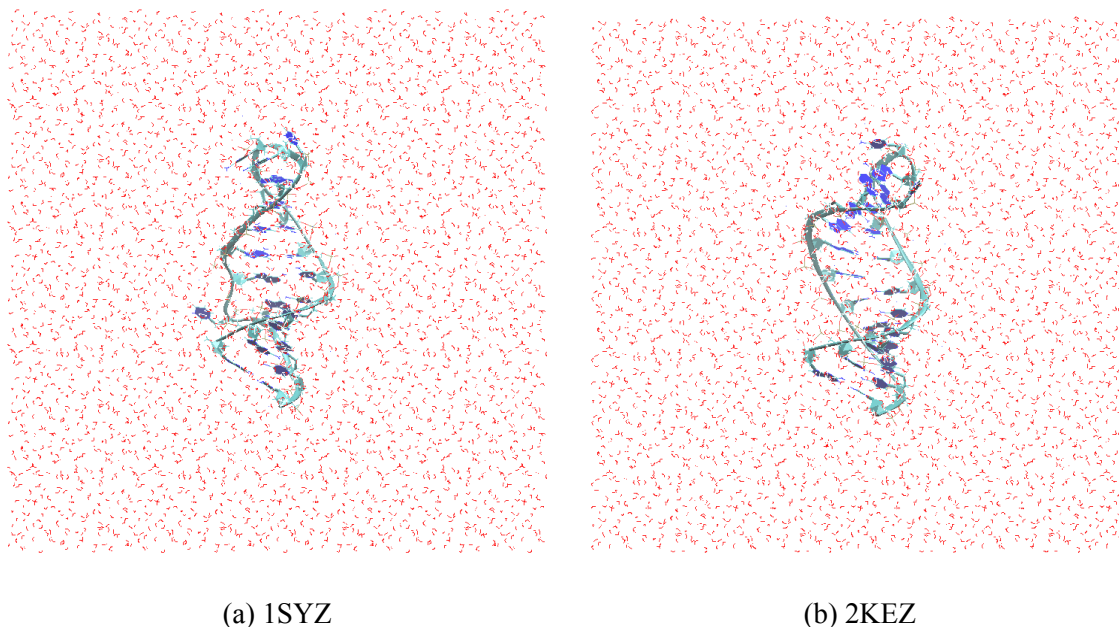
Interakcije prisutne u oba aniona prisutne su i u dianionu kvercetina na slici 6d.

U slučaju aniona i dianiona kvercetina, na slikama 6b, 6c i 6d tamnoplave plohe označavaju vrlo snažne nekovalentne interakcije koje upućuju na vrlo čvrsti solvatni kavez molekula vode oko određenih atomskih skupina kvercetina.

Izokonturne plohe na slici 7 govore o termičkoj stabilnosti pojedinih interakcija. Niska vrijednost termalnog fluktuacijskog indeksa (plava boja) ukazuje na malu termalnu fluktuaciju, odnosno čvrsti solvatni kavez molekula vode oko molekula kvercetina, dok visoka vrijednost termalnog fluktuacijskog indeksa (crvena boja) ukazuje na veliku termalnu fluktuaciju okolnih molekula vode i na vrlo brzu reorganizaciju solvatnog kaveza.

Na temelju provedenih izračuna nekovalentnih interakcija i termalnog fluktuacijskog in-

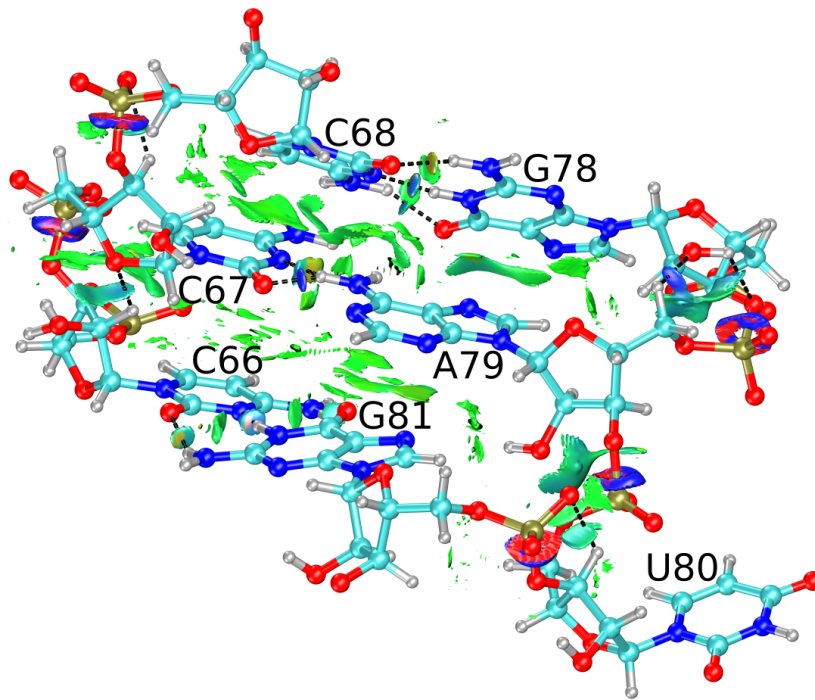
deksa za molekulu i anione kvercetina s okolnim fluktuirajućim molekulama vode može se pretpostaviti da je reaktivnom radikalu u antioksidativnoj reakciji kvercetina sterički olakšan pristup na područjima oslabljenog solvatnog kaveza, odnosno na područjima ispod i iznad ravnine A i C prstena ( $\pi$ -interakcije).



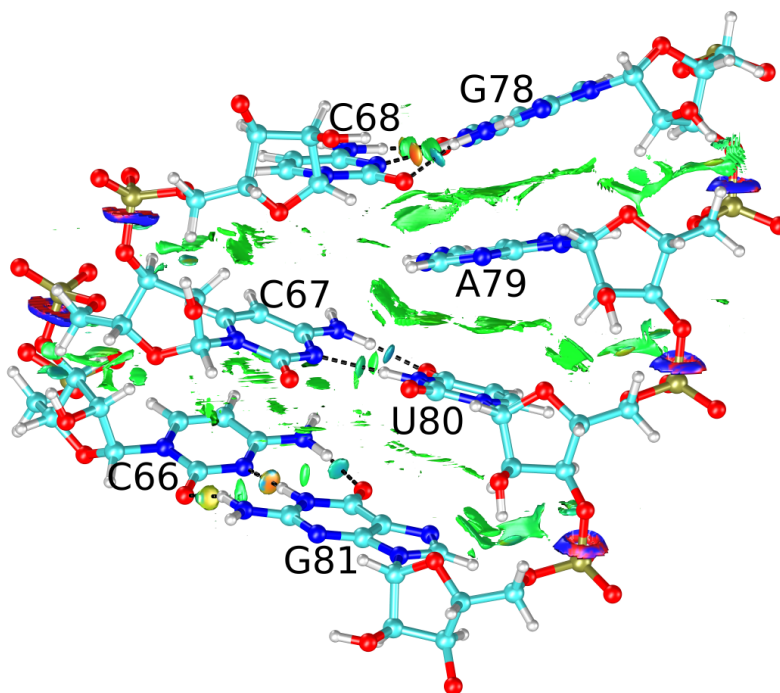
Slika 8: Model fragmenta U6 snRNA u kvadru ispunjenom molekulama otapala (vode)

U istraživanju procesa reorganizacije konformacije fragmenta U6 snRNA koja uključuje preklapanje (eng. *conformational switch*) baze U na položaju 80, odabran je model kod kojeg su strukture prisutne na pH 5.7 (PDB kod 1SYZ, U80 okrenut prema otapalu) i 8.0 (PDB kod 2KEZ, U80 okrenut prema unutrašnjosti fragmenta) u periodičkim graničnim uvjetima smještene u kvadar ispunjen molekulama vode. Primjeri računalnih modela za navedene fragmente prikazani su na slici 8.

Na slici 9 prikazane su reprezentativne strukture dobivene računom molekulske dinamike koje prikazuju nekovalentne interakcije između baza za slučajeve u kojima je U80 okrenut prema unutrašnjosti fragmenta i prema otapalu. Elektronska gustoća iz koje su izračunate vrijednosti  $s(r)$ , odnosno nekovalentne interakcije između baza dobivena je iz vrlo točnih kvantno mehaničkih računa (Mihaljević i Pilepić, 2018). Iz slike 9 jasno se vide disperzne interakcije (zelene plohe) koje se nalaze između samih baza i stabiliziraju susjedne baze. Sama uzvojnica stabilizirana je također i vodikovim vezama između Watson-Crickovih i ne-Watson-Crickovih parova baza. Kod Watson-Crickovih parova baza (C66-G81, C68-G78) vodikove veze označavaju tri plava elipsoida. Između C67 i A79 radi se o bifurkacijskoj vodikovoj vezi između vodikova

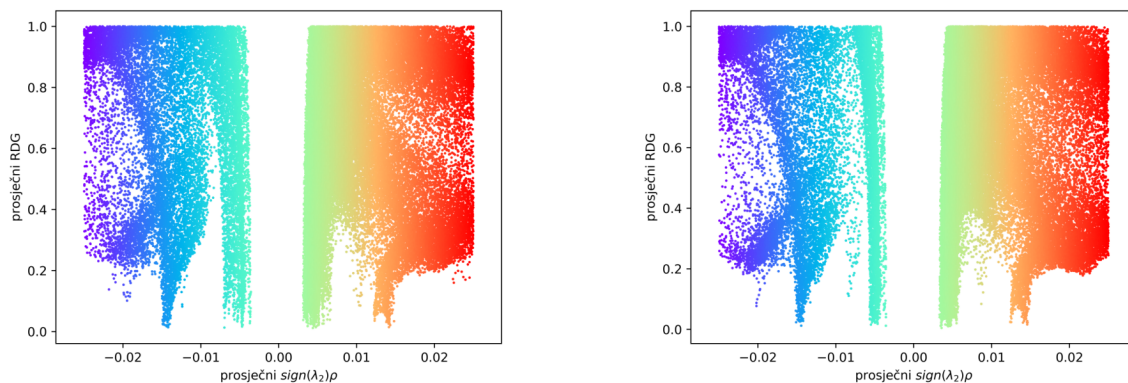


(a) fragment s U80 okrenutim prema otapalu



(b) fragment s U80 okrenutim prema unutrašnjosti fragmenta

Slika 9: Izokonturne plohe ( $s = 0.45 a.u.$ ) za nekovalentne interakcije između susjednih baza fragmenta RNA. Boje na plavo-zeleno-crvenoj skali odgovaraju jakim privlačnim, slabim privlačnim i odbojnim te jakim odbojnim nekovalentnim interakcijama, ovisno o vrijednosti  $\text{sign}(\lambda_2)\rho$  između  $-0.025$  i  $0.025$ .



(a) struktura s fiksiranim koordinatama atoma U80 nukleotida

(b) struktura s fiksiranim koordinatama atoma U80 baze

Slika 10: Prikazi ovisnosti  $\overline{s(r)}$  o  $\text{sign}(\lambda_2)\rho$  za modelni fragment U6 snRNA s U80 okrenutim prema unutrašnjosti fragmenta. Plavo-zeleno-crvena skala označava vrijednosti  $\text{sign}(\lambda_2)\rho$  u rasponu od  $-0.025$  do  $0.025$ .

atoma iz amino skupine A79 i atoma kisika iz karbonilne skupine te N(3) iz C67. Kod C67-U80 baznog para vodikov atom iz U80, za razliku od onog iz A79, ne tvori bifurkacijsku već jednostavnu vodikovu vezu s N(3) C67. Druga vodikova veza nastaje između vodikova atoma iz amino skupine C67 i kisikovog atoma U80 vezanog na C(2).

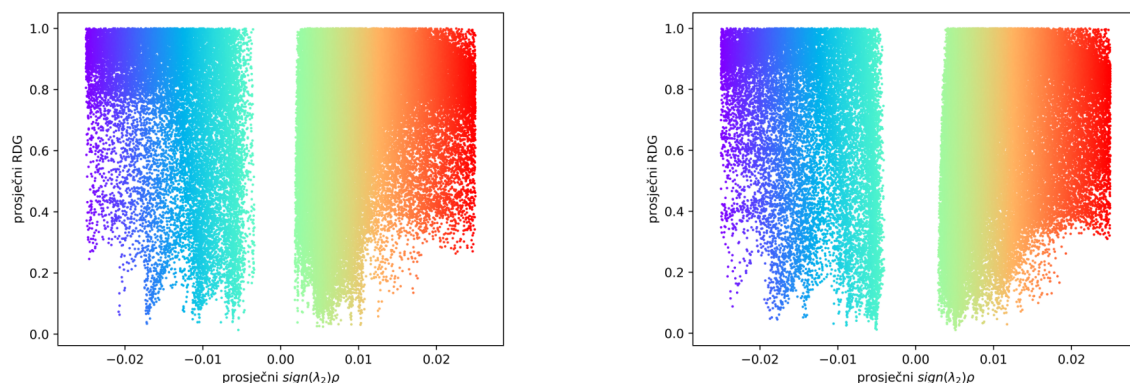
Na slikama 10 i 11 prikazane su ovisnosti  $\overline{s(r)}$  o  $\text{sign}(\lambda_2)\rho$  za nekovalentne interakcije između nukleotida i baze U80 s fluktuirajućom okolinom koja uključuje ostale nukleotide U6 fragmenta, molekule vode i natrijeve ione.

Računi provedeni za strukture s fiksiranim koordinatama baze otkrivaju nešto veći broj nekovalentnih interakcija s fluktuirajućom okolinom.

Iz slike 12 vidljivo je da u strukturi s uracilom okrenutim prema otapalu dominiraju nekovalentne interakcije s vodom. Karbonilni kisikovi atomi tvore vodikove veze s fluktuirajućim molekulama vode, kao i vodikov atom vezan na dušikov atom iz pirimidinskog prstena, što ukazuje na to da je ta konformacija fragmenta djelomično stabilizirana i solvatnim kavezom kojeg čine okolne molekule vode, osobito oko kisikovih atoma u bazi.

Slika 13 otkriva dodatne nekovalentne interakcije između U80 i fluktuirajućih okolnih baza u konformaciji pri kojoj je U80 okrenut prema unutrašnjosti fragmenta. Čvrste nekovalentne interakcije (tamnoplave plohe) prisutne su u blizini karbonilnih kisikovih atoma i dušikovog atoma u pirimidinskom prstenu. Zelene plohe predstavljaju  $\pi$ -interakcije koje dodatno učvršćuju





(a) struktura s fiksiranim koordinatama atoma U80 nukleotida

(b) struktura s fiksiranim koordinatama atoma U80 baze

Slika 11: Prikazi ovisnosti  $\overline{s(r)}$  o  $\text{sign}(\lambda_2)\rho$  za modelni fragment U6 snRNA s U80 okrenutim prema otapalu. Plavo-zelena-crvena skala označava vrijednosti  $\text{sign}(\lambda_2)\rho$  u rasponu od  $-0.025$  do  $0.025$ .

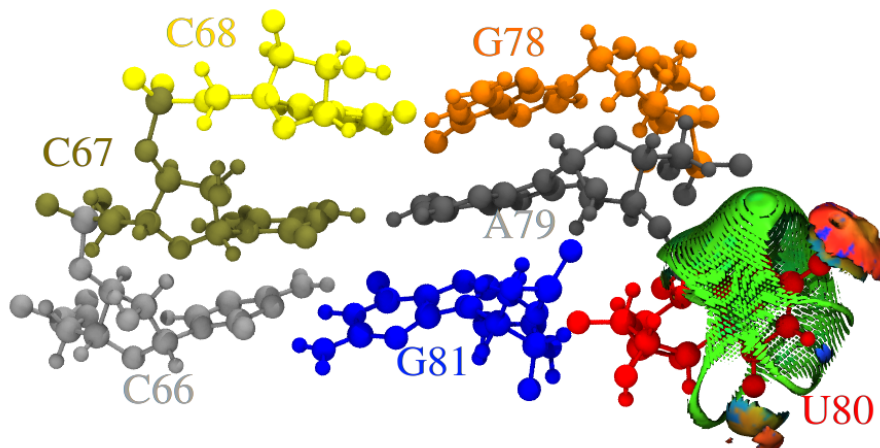
cijelu strukturu.

U blizini karbonilnog kisikovog atoma vezanog na C(4) baze U80 na slici 13b uočljiva su dva plava diska koja ukazuju na uspostavu dvije različite vodikove veze u kojima taj atom sudjeluje. Analizom struktura u vremenu utvrđeno je da se radi o vodikovim vezama s oba vodikova atoma u amino skupini C67. Udaljenosti vodikovih atoma iz amino skupine C67 i karbonilnog kisika U80 tijekom molekulske dinamičke simulacije u trajanju od 20 ns prikazane su na slici 14. Razlike udaljenosti između atoma odgovaraju dvostrukim udaljenostima odgovarajućih plavih diskova koji se mogu pripisati tim vodikovim vezama.

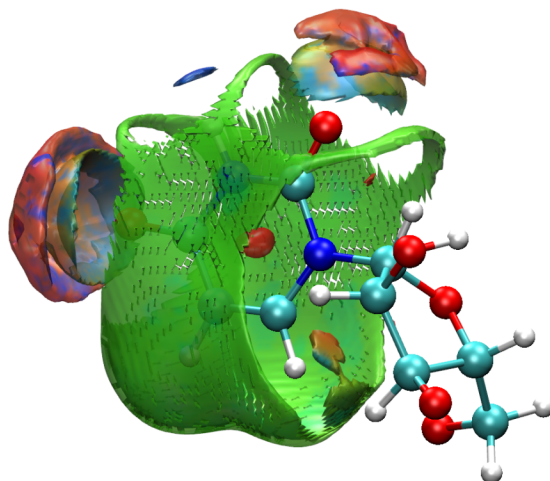
Analizom struktura u vremenu uočeno je i da se baze C66, C67 i G81 izmjenjuju u stvaranju vodikovih veza s bazom U80. Odgovarajuće strukture prikazane su na slikama 15a i 15b, a na slici 15c prikazane su udaljenosti atoma koji tvore vodikove veze kroz tijek simulacije. Linije na grafu prikazuju udaljenosti atoma označenih linijama jednake boje na slikama 15a i 15b. Jasno je vidljiva izmjena navedenih konformacija oko 100. i 700. strukture zabilježene u simulaciji molekulske dinamike.

Na konformaciji prikazanoj na slici 15a vide se vodikove veze između karbonilnog kisikovog atoma U80 vezanog na C(4) i vodikovog atoma iz amino skupine C67 te između vodikovog atoma vezanog na N(3) U80 i N(3) atoma C67.

Na konformaciji prikazanoj na slici 15b vide se vodikove veze između karbonilnog kisiko-

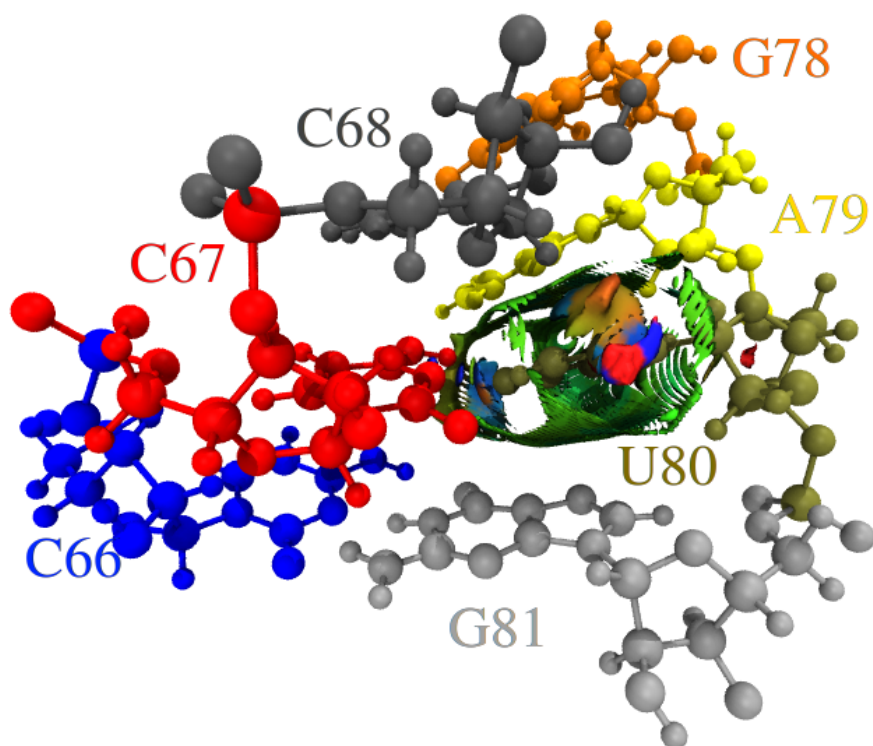


(a) prikaz izokonturne plohe u kontekstu susjednih i nasuprotnih nukleotida

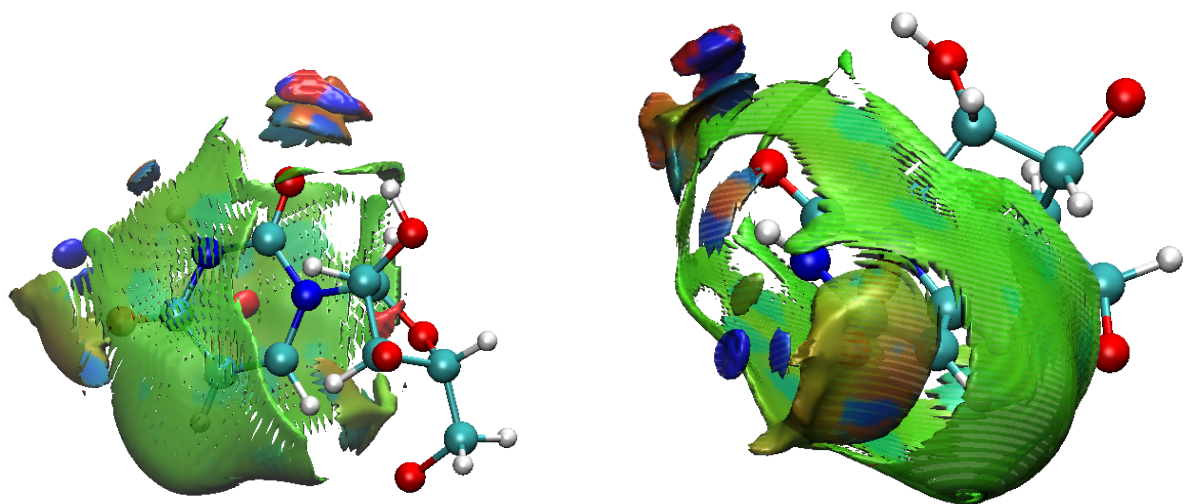


(b) uvećani prikaz izokonturne plohe

Slika 12: Izokonturne plohe ( $s = 0.3 a.u.$ ) za nekovalentne interakcije baze U80 s fluktuirajućom okolinom u konformaciji u kojoj je U80 okrenut prema otapalu. Boje na plavo-zeleno-crvenoj skali odgovaraju jakim privlačnim, slabim privlačnim i odbojnim te jakim odbojnim nekovalentnim interakcijama, ovisno o vrijednosti  $\text{sign}(\lambda_2)\rho$  između  $-0.025$  i  $0.025$ .

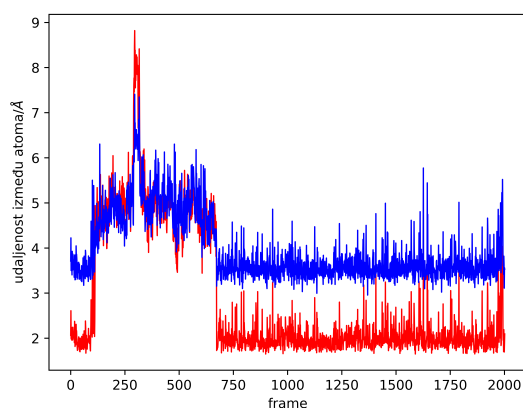


(a) prikaz izokonturne plohe u kontekstu susjednih i nasuprotnih nukleotida



(b) prikaz izokonturne plohe iz dva različita kuta - na lijevoj slici vide se interakcije s ribozom, a na desnoj interakcije s drugim bazama

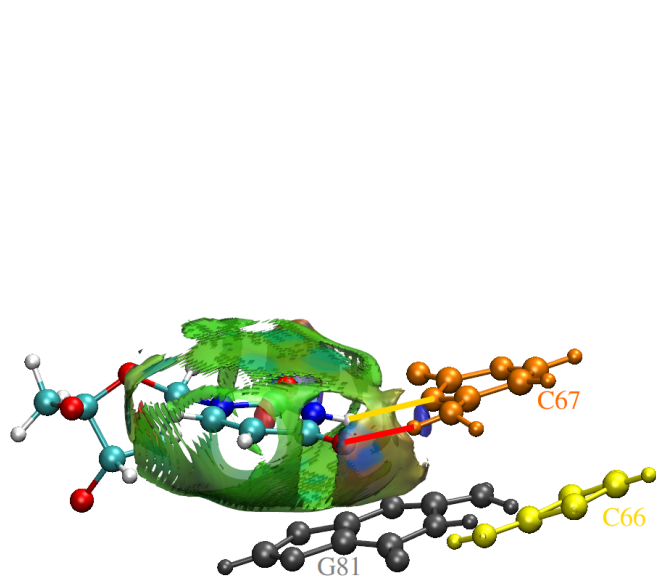
Slika 13: Izokonturne plohe ( $s = 0.3 a.u.$ ) za nekovalentne interakcije baze U80 s fluktuirajućom okolinom u konformaciji u kojoj je U80 okrenut prema unutrašnjosti fragmenta. Boje na plavo-zeleno-crvenoj skali odgovaraju jakim privlačnim, slabim privlačnim i odbojnim te jakim odbojnim nekovalentnim interakcijama, ovisno o vrijednosti  $\text{sign}(\lambda_2)\rho$  između  $-0.025$  i  $0.025$ .



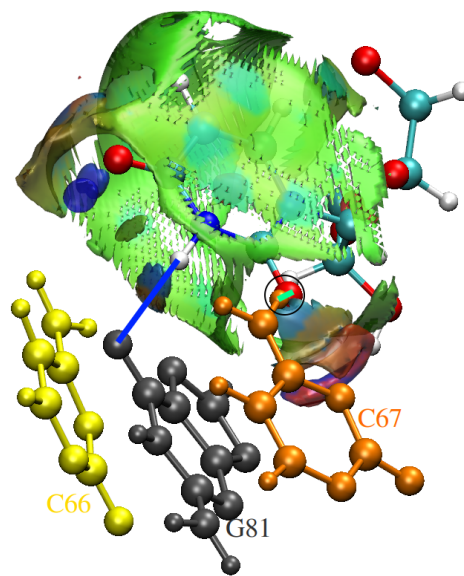
Slika 14: Udaljenosti između dva vodikova atoma iz amino skupine C67 i karbonilnog kisikovog atoma vezanog na C(4) U80 tijekom molekulske dinamičke simulacije u trajanju od 20 ns.

vog atoma iz G81 i vodikovog atoma vezanog na N(3) U80, kao i vodikovog atoma iz amino skupine C67 i karbonilnog kisikovog atoma U80 vezanog na C(2).

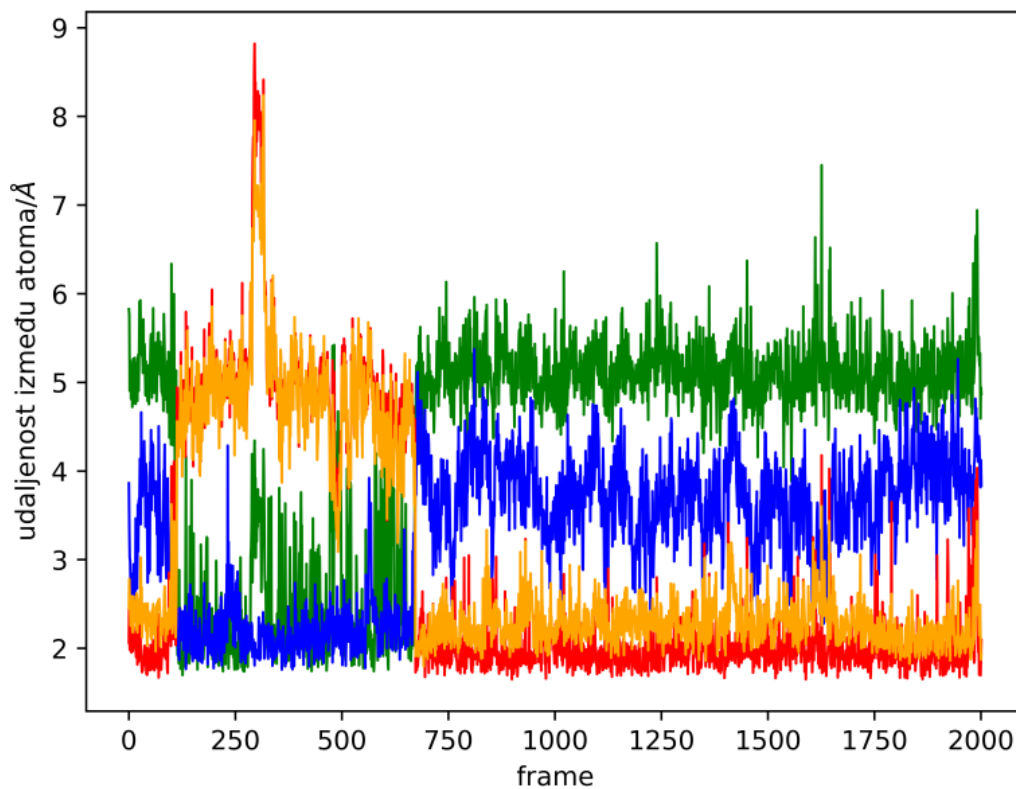
Slike 16 i 17 prikazuju stabilnost pojedinih nekovalentnih interakcija. Iz slike 17 može se zaključiti veća stabilnost  $\pi$ -interakcija baze U80 s bazom A79 od onih s bazom G81. Dobi-  
 veni rezultati omogućuju detaljnu analizu nekovalentnih interakcija U80 baze tijekom procesa preklapanja (eng. *conformational switch*) u okviru reorganizacije konformacije fragmenta U6, pri čemu se utvrdilo da u cijelom procesu sudjeluju vodikove veze između baza, baza i okolnih molekula vode te  $\pi$ -interakcije između baza.



(a) konformacija u kojoj s U80 vodikove veze tvori isključivo C67

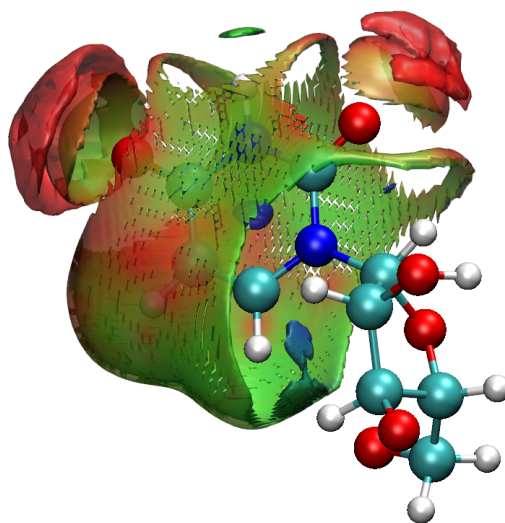


(b) konformacija u kojoj baze C67 i G81 tvore vodikove veze s U80

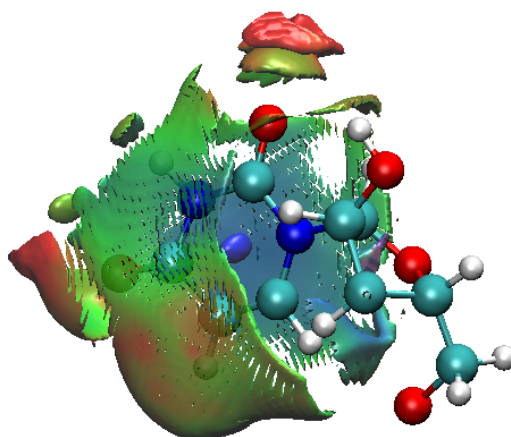


(c) udaljenosti između atoma prikazanih linijama na slikama (a) i (b) tijekom molekulske dinamičke simulacije u trajanju od 20 ns

Slika 15: Prikaz dvije različite konformacije baza susjednih uracilu na poziciji 80.



Slika 16: Izokonturne plohe ( $s = 0.3 \text{ a.u.}$ ) za nekovalentne interakcije U80 baze fragmenta U6 snRNA okrenutog prema otapalu s fluktuirajućom okolinom koja uključuje ostale nukleotide U6 fragmenta, molekule vode i natrijeve ione. Boje na plavo-zeleno-crvenoj skali odgovaraju vrijednosti termalnog fluktuacijskog indeksa između 0.0 i 1.5.



Slika 17: Izokonturne plohe ( $s = 0.3 \text{ a.u.}$ ) za nekovalentne interakcije U80 baze fragmenta U6 snRNA okrenutog prema unutrašnjosti fragmenta s fluktuirajućom okolinom koja uključuje ostale nukleotide U6 fragmenta, molekule vode i natrijeve ione. Boje na plavo-zeleno-crvenoj skali odgovaraju vrijednostima termalnog fluktuacijskog indeksa između 0.0 i 1.5.

## 5 Zaključci

- Pomoću molekulske dinamičke i kvantno mehaničke računskih metoda provedena su istraživanja nekovalentnih interakcija na dva modela različitih biokemijski i biomedicinski važnih sustava: sustavu molekule i odgovarajućih aniona kvercetina s okolnim molekulama vode te promjena konformacije fragmenta U6 snRNA u vodi.
- Računalno modeliranje solvatacije (hidratacije) sustava molekule i odgovarajućih aniona kvercetina s okolnim molekulama vode provedeno je za sve strukture prisutne na fiziološkom pH pri čemu su te strukture smještene u kvadar ispunjen molekulama vode u periodičkim uvjetima. Na takvom modelu, provedeni su računi molekulske dinamike u vremenu od 20 ns, a iz dobivenih trajektorija izračunati su prosječni reducirani gradijent gustoće i termalni fluktuacijski indeksi. Vizualna prezentacija dobivenih rezultata omogućila je analizu prosječnih nekovalentnih interakcija molekula kvercetina s fluktuirajućom okolinom molekula vode.
- Utvrđeno je da je solvatni kavez molekula otapala (vode) oko karbonilne i OH skupina kvercetina vrlo čvrst, slabiji oko B prstena te najslabiji ispod i iznad ravnine A i C prstena te se može pretpostaviti da je na tome mjestu sterički olakšan pristup reaktivnom radikalu u antioksidativnoj reakciji kvercetina.
- Računalno modeliranje sustava fragmenta U6 snRNA u vodi provedeno je za dvije različite konformacije koje se razlikuju u orijentaciji U80 koje su povezane i s biološkom funkcijom tog fragmenta. Strukture su smještene u kvadar ispunjen molekulama vode u periodičkim uvjetima te su na takvom modelu provedeni računi molekulske dinamike u vremenu od 20 ns, a iz dobivenih trajektorija izračunati su prosječni reducirani gradijenti gustoće, termalni fluktuacijski indeksi te kvantno mehanički računi elektronske gustoće za reprezentativne strukture. Vizualna prezentacija dobivenih rezultata omogućila je analizu prosječnih nekovalentnih interakcija baze U80 fragmenta U6 s fluktuirajućom okolinom koja uključuje ostale okolne baze, molekule vode i natrijeve ione.
- Dobiveni rezultati omogućili su detaljnu analizu nekovalentnih interakcija U80 baze tijekom procesa preklapanja u okviru reorganizacije konformacije fragmenta U6, pri čemu se utvrdilo da u cijelom procesu sudjeluju vodikove veze između baza i okolnih molekula vode te  $\pi$ -interakcije između baza.

## 6 Literatura

- Atkins, P i de Julio, P. Physical Chemistry. New York, SAD, W. H. Freeman & Company, 2010, str. 404.
- Atkins, P i de Julio, P. Physical Chemistry for the Life Sciences. New York, SAD, W. H. Freeman & Company, 2011, str. 437.
- Baaden, M, Burgard, M i Wipff, G. TBP at the Water–Oil Interface: The Effect of TBP Concentration and Water Acidity Investigated by Molecular Dynamics Simulations. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2001, 105, 11131–11141.
- Bayly, CI, Cieplak, P, Cornell, WD i Kollman, PA. A Well-Behaved Electrostatic Potential Based Method Using Charge Restraints for Deriving Atomic Charges: The RESP Model. *J. Phys. Chem.* 1993, 97, 10269–10280.
- Berendsen, HJC, Postma, JPM, van Gunsteren, WF, DiNola, A i Haak, JR. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *The Journal of Chemical Physics*. 1984, 81, 3684–3690.
- Borštnik, U, VandeVondele, J, Weber, V i Hutter, J. Sparse matrix multiplication: The distributed block-compressed sparse row library. *Parallel Computing*. 2014, 40, 47–58.
- Brow, DA. Allosteric Cascade of Spliceosome Activation. *Annual Review of Genetics*. 2002, 36, 333–360.
- Brow, DA i Guthrie, C. Spliceosomal RNA U6 is remarkably conserved from yeast to mammals. *Nature*. 1988, 334, 213.
- Case, DA, Ben-Shalom, IY, Brozell, SR, Cerutti, D, Cheatham III, TE, Cruzeiro, VWD, Darden, T, Duke, R, Ghoreishi, D, Giambasu, G, Giese, T, Gilson, M, Gohlke, H, Goetz, A, Greene, D, Harris, R, Homeyer, N, Huang, Y, Izadi, S, Kovalenko, A, Krasny, R, Kurtzman, T, Lee, TS, LeGrand, S, Li, P, Lin, C, Liu, J, Luchko, T, Luo, R, Man, V, Mermelstein, DJ, Merz, KM, Miao, Y, Monard, G, Nguyen, C, Nguyen, H, Onufriev, A, Pan, F, Qi, R, Roe, DR, Roitberg, A, Sagui, C, Schott-Verdugo, S, Shen, J, Simmerling, CL, Smith, J, Swails, J, Walker, RC, Wang, J, Wei, H, Wilson, L, Wolf, RM, Wu, X, Xiao, L, Xiong, Y, D. M., YD i Kollman, PA. AMBER 2018, 2018, University of California, San Francisco.
- Černý, J i Hobza, P. Non-covalent interactions in biomacromolecules. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2007, 9, 5291–5303.
- Chaudret, R, Courcy, Bd, Contreras-García, J, Gloaguen, E, Zehnacker-Rentien, A, Mons, M i Piquemal, JP. Unraveling non-covalent interactions within flexible biomolecules: from



- electron density topology to gas phase spectroscopy. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2014, 16, 9876–9891.
- Contreras-García, J, Johnson, ER, Keinan, S, Chaudret, R, Piquemal, JP, Beratan, D i Yang, W. NCIPLOT: A Program for Plotting Noncovalent Interaction Regions. *Journal of Chemical Theory and Computation*. 2011, 7, 625–632.
- Darden, T, York, D i Pedersen, L. Particle mesh Ewald: An Nlog(N) method for Ewald sums in large systems. *The Journal of Chemical Physics*. 1993, 98, 10089–10092.
- Fabijanić, I, Matković-Čalogović, D, Pilepić, V, Ivanišević, I, Mohaček-Grošev, V i Sanković, K. New investigations of the guanine trichloro cuprate(II) complex crystal. *Journal of Molecular Structure*. 2017, 1128, 317–324.
- Fabijanić, I, Matković-Čalogović, D, Pilepić, V i Sanković, K. Structural and computational analysis of intermolecular interactions in a new 2-thiouracil polymorph. *Acta Crystallographica Section C*. 2017, 73, 1078–1086.
- Frigo, M i Johnson, SG. The Design and Implementation of FFTW3. *Proceedings of the IEEE*. 2005, 93, 216–231.
- Galano, A, Mazzone, G, Alvarez-Diduk, R, Marino, T, Alvarez-Idaboy, JR i Russo, N. Food Antioxidants: Chemical Insights at the Molecular Level. *Annual Review of Food Science and Technology*. 2016, 7, 335–352.
- Goedecker, S, Teter, M i Hutter, J. Separable dual-space Gaussian pseudopotentials. *Physical Review B, Condensed Matter*. 1996, 54, 1703–1710.
- González, J, Baños, I, León, I, Contreras-García, J, Cocinero, EJ, Lesarri, A, Fernández, JA i Millán, J. Unravelling Protein–DNA Interactions at Molecular Level: A DFT and NCI Study. *Journal of Chemical Theory and Computation*. 2016, 12, 523–534.
- Götz, AW, Williamson, MJ, Xu, D, Poole, D, Le Grand, S i Walker, RC. Routine Microsecond Molecular Dynamics Simulations with AMBER on GPUs. 1. Generalized Born. *Journal of Chemical Theory and Computation*. 2012, 8, 1542–1555.
- Hartwigsen, C, Goedecker, S i Hutter, J. Relativistic separable dual-space Gaussian pseudopotentials from H to Rn. *Physical Review B*. 1998, 58, 3641–3662.
- Heim, KE, Tagliaferro, AR i Bobilya, DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2002, 13, 572–584.

- Hertog, M, Feskens, E, Kromhout, D, Hertog, M, Hollman, P, Hertog, M i Katan, M. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *The Lancet*. 1993, 342, 1007–1011.
- Humphrey, W, A., D i K., S. VMD: visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*. 1996, 14, 33–38.
- Hunter, JD. Matplotlib: A 2D graphics environment. *Computing in Science & Engineering*. 2007, 9, 90–95.
- Hutter, J, Iannuzzi, M, Schiffmann, F i VandeVondele, J. cp2k: atomistic simulations of condensed matter systems. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*. 2014, 4, 15–25.
- Johnson, ER, Keinan, S, Mori-Sanchez, P, Contreras-Garcia, J, Cohen, A i Yang, W. Revealing Noncovalent Interactions. *J. Am. Chem. Soc.* 2010, 132, 6498–6506.
- Krack, M. Pseudopotentials for H to Kr optimized for gradient-corrected exchange-correlation functionals. *Theoretical Chemistry Accounts*. 2005, 114, 145–152.
- Le Grand, S, Götz, AW i Walker, RC. SPFP: Speed without compromise—A mixed precision model for GPU accelerated molecular dynamics simulations. *Computer Physics Communications*. 2013, 184, 374–380.
- Lemańska, K, Szymusiak, H, Tyrakowska, B, Zieliński, R, Soffers, AEMF i Rietjens, IMCM. The influence of pH on antioxidant properties and the mechanism of antioxidant action of hydroxyflavones. *Free Radical Biology and Medicine*. 2001, 31, 869–881.
- Lippert, G, Hutter, J i Parrinello, M. A hybrid Gaussian and plane wave density functional scheme. *Molecular Physics*. 1997, 92, 477–488.
- Lu, T i Chen, F. Multiwfn: A multifunctional wavefunction analyzer. *J. Comput. Chem.* 2012, 580–592.
- Mihaljević, F i Pilepić, V. The non-covalent interaction plots of U6 internal stem-loop domain. Poster prezentiran na međunarodnom znanstvenom skupu "From Solid State to Biophysics IX", Cavtat, Hrvatska, 16.-23.06.2018.
- Müller-Dethlefs, K i Hobza, P. Noncovalent Interactions: A Challenge for Experiment and Theory. *Chem. Rev.* 2000, 100, 143–168.
- Otero-de-la-Roza, A, Luaña, V, Tiekink, ERT i Zukerman-Schpector, J. Unraveling Interactions in Molecular Crystals Using Dispersion Corrected Density Functional Theory: The Case

- of the Epoxydihydroarsanthrene Molecules. *Journal of Chemical Theory and Computation*. 2014, 10, 5010–5019.
- Otero-de-la-Roza, A, Johnson, ER i Contreras-García, J. Revealing non-covalent interactions in solids: NCI plots revisited. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2012, 14, 12165–12172.
- Panche, AN, Diwan, AD i Chandra, SR. Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*. 2016, 5, 1–15.
- Pastor, RW, Brooks, BR i Szabo, A. An analysis of the accuracy of Langevin and molecular dynamics algorithms. *Molecular Physics*. 1988, 65, 1409–1419.
- Phillips, JC, Braun, R, Wang, W, Gumbart, J, Tajkhorshid, E, Villa, E, Chipot, C, Skeel, RD, Kale, L i Schulten, K. Scalable molecular dynamics with NAMD. *Journal of Computational Chemistry*. 2005, 26, 1781–1802.
- Price, DJ i Brooks, C. A modified TIP3P water potential for simulation with Ewald summation. *J. Chem. Phys.* 2004, 121, 10096–10103.
- Reiter, NJ, Blad, H, Abildgaard, F i Butcher, SE. Dynamics in the U6 RNA Intramolecular Stem–Loop: A Base Flipping Conformational Change, *Biochemistry*. 2004, 43, 13739–13747.
- Riley, K i Hobza, P. Noncovalent interactions in biochemistry. *WIREs Comput Mol Sci*. 2011, 1, 3–17.
- Romano, B, Pagano, E, Montanaro, V, Fortunato, AL, Milic, N i Borrelli, F. Novel Insights into the Pharmacology of Flavonoids. *Phytotherapy Research*. 2013, 27, 1588–1596.
- Ryckaert, JP, Ciccotti, G i Berendsen, HJC. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. *Journal of Computational Physics*. 1977, 23, 327–341.
- Salomon-Ferrer, R, Götz, AW, Poole, D, Le Grand, S i Walker, RC. Routine Microsecond Molecular Dynamics Simulations with AMBER on GPUs. 2. Explicit Solvent Particle Mesh Ewald. *Journal of Chemical Theory and Computation*. 2013, 9, 3878–3888.
- Sashital, DG, Allmann, AM, Van Doren, SR i Butcher, SE. Structural Basis for a Lethal Mutation in U6 RNA, *Biochemistry*. 2003, 42, 1470–1477.
- Schütt, O, Messmer, P, Hutter, J i VandeVondele, J. GPU-Accelerated Sparse Matrix–Matrix Multiplication for Linear Scaling Density Functional Theory: U: *Electronic Structure Calculations on Graphics Processing Units*. Walker, RC i Götz, AW, urednici, West Sussex, Ujedinjeno Kraljevstvo, John Wiley & Sons, Ltd, 2016, str. 173–190.

- Stone, AJ. Physical Basis of Intermolecular Interactions: U: *Non-covalent interactions in quantum chemistry and physics: theory and applications*. Otero de la Roza, A i DiLabio, GA, urednici, Amsterdam, Nizozemska, Elsevier, 2017, str. 7–8.
- VandeVondele, J i Hutter, J. An efficient orbital transformation method for electronic structure calculations. *The Journal of Chemical Physics*. 2003, 118, 4365–4369.
- VandeVondele, J, Krack, M, Mohamed, F, Parrinello, M, Chassaing, T i Hutter, J. Quickstep: Fast and accurate density functional calculations using a mixed Gaussian and plane waves approach. *Computer Physics Communications*. 2005, 167, 103–128.
- Vanommeslaeghe, K, Hatcher, E, Acharya, C, Kundu, S, Zhong, S, Shim, J, Darian, E, Guvench, O, Lopes, P, Vorobyov, I i Mackerell, AD. CHARMM general force field: A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields. *Journal of Computational Chemistry*. 2010, 31, 671–690.
- Venditti, V, Clos, L, Niccolai, N i Butcher, SE. Minimum-Energy Path for a U6 RNA Conformational Change Involving Protonation, Base-Pair Rearrangement and Base Flipping. *Journal of Molecular Biology*. 2009, 391, 894–905.
- Wang, J, Cieplak, P i Kollman, PA. How well does a restrained electrostatic potential (RESP) model perform in calculating conformational energies of organic and biological molecules? *J. Comput. Chem*. 2000, 21, 1049–1074.
- Wang, J, Wolf, RM, Caldwell, JW, Kollamn, PA i Case, DA. Development and testing of a general Amber force field. *J. Comput. Chem*. 2004, 25, 1157–1174.
- Wang, W, Sun, C, Mao, L, Ma, P, Liu, F, Yang, J i Gao, Y. The biological activities, chemical stability, metabolism and delivery systems of quercetin: A review. *Trends in Food Science & Technology*. 2016, 56, 21–38.
- Wu, P, Chaudret, R, Yang, W i Hu, X. Noncovalent Interaction Analysis in Fluctuating Environments. *Journal of Chemical Theory and Computation*. 2013, 9, 2226–2234.
- Zgarbová, M, Otyepka, M, Sponer, J, Mládek, A, Banáš, P, Cheatham, TE i Jurečka, P. Refinement of the Cornell et al. Nucleic Acids Force Field Based on Reference Quantum Chemical Calculations of Glycosidic Torsion Profiles. *Journal of Chemical Theory and Computation*. 2011, 7, 2886–2902.

## 7 Sažetak/Summary

### 7.1 Sažetak

Istraživanja nekovalentnih interakcija na dva modela različitih biokemijski i biomedicinski važnih sustava: sustavu molekule i odgovarajućih aniona kvercetina s okolnim molekulama vode te promjena konformacije fragmenta U6 snRNA u vodi provedena su pomoću molekulske dinamičkih i kvantno mehaničkih računskih metoda.

Računalno modeliranje solvatacije (hidratacije) sustava molekule i odgovarajućih aniona kvercetina s okolnim molekulama vode provedeno je za sve strukture prisutne na fiziološkom pH pri čemu su te strukture smještene u kvadar ispunjen molekulama vode u periodičkim uvjetima. Na takvom modelu, provedeni su računi molekulske dinamike u vremenu od 20 ns, a iz dobivenih trajektorija izračunati su prosječni reducirani gradijenti gustoće i termalni fluktuacijski indeksi. Vizualna prezentacija dobivenih rezultata omogućila je analizu prosječnih nekovalentnih interakcija molekula kvercetina s fluktuirajućom okolinom molekula vode pri čemu je utvrđeno da je solvatni kavez molekula otapala (vode) oko karbonilnih i OH skupina kvercetina vrlo čvrst, slabiji oko B prstena te najslabiji ispod i iznad ravnine A i C prstena te se može pretpostaviti da je na tome mjestu sterički olakšan pristup reaktivnom radikalu u antioksidativnoj reakciji kvercetina.

Računalno modeliranje sustava fragmenta U6 snRNA u vodi provedeno je za dvije različite konformacije koje se razlikuju u orijentaciji U80 koje su povezane s biološkom funkcijom tog fragmenta. Strukture su smještene u kvadar ispunjen molekulama vode u periodičkim uvjetima te su na takvom modelu provedeni računi molekulske dinamike u vremenu od 20 ns, a iz dobivenih trajektorija izračunati su prosječni reducirani gradijenti gustoće, termalni fluktuacijski indeksi te kvantno mehanički računi elektronske gustoće za reprezentativne strukture. Vizualna prezentacija dobivenih rezultata omogućila je detaljnu analizu prosječnih nekovalentnih interakcija baze U80 fragmenta U6 s fluktuirajućom okolinom koja uključuje ostale okolne baze, molekule vode i natrijeve ione tijekom procesa preklapanja u okviru reorganizacije konformacije fragmenta U6, pri čemu se utvrdilo da u cijelom procesu sudjeluju vodikove veze između baza i okolnih molekula vode te  $\pi$ -interakcije između baza.

## 7.2 Summary

The research of non-covalent interactions was performed on two models of different biochemically and biomedically important systems: a system of quercetin molecule and the corresponding anions in a water solution and a system of the U6 fragment of snRNA in a water solution, by using molecular dynamic and quantum chemistry calculation methods.

Computer modelling of the solvation (hydration) of the system containing quercetin molecule with surrounding water molecules was performed for all of the quercetin structures present in physiological pH. The structures were placed in a box filled with water molecules. Molecular dynamics calculations were performed for a time of 20 ns in periodic boundary conditions. Values of average reduced density gradient and thermal fluctuation indices were calculated from the obtained trajectories. Visual presentation of calculated results enabled the analysis of the average non-covalent interactions of quercetin molecule with fluctuating environment made of water molecules. It was found that the solvent cages around carbonyl and OH functional groups are very tight, weak around the B ring and weaker above and below A and C ring planes. It can be assumed that the approach of the reactive radical in the antioxidative reaction of quercetin is sterically enabled around these areas.

Computer modelling of the U6 snRNA fragment system in water was performed for two different fragment conformations that differ in the orientation of U80 base. These conformations are related to the biological function of the fragment. Structures were placed in a box filled with water molecules. Molecular dynamics calculations were performed for a time of 20 ns in periodic boundary conditions. Visual presentation of calculated results enabled the analysis of the average non-covalent interactions of U80 base of the U6 RNA with the fluctuating environment that includes other nucleotides, water molecules and sodium ions during the process of U80 conformational switch. It was found that hydrogen bonds between base pairs, bases and surrounding water molecules, as well as  $\pi$ -interactions between bases are involved in the process.

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija/Medicinska biokemija  
Zavod za fizikalnu kemiju  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### MODELIRANJE NEKOVALENTNIH INTERAKCIJA U PROCESIMA SOLVATACIJE KVERCETINA I REORGANIZACIJE KONFORMACIJE FRAGMENTA U6 snRNA

Frano Mihaljević

#### SAŽETAK

Istraživanja nekovalentnih interakcija na dva modela različitih biokemijski i biomedicinski važnih sustava: sustavu molekule i odgovarajućih aniona kvercetina s okolnim molekulama vode te promjena konformacije fragmenta U6 snRNA u vodi provedena su pomoću molekulske dinamičke i kvantno mehaničke računskih metoda.

Računalno modeliranje solvatacije (hidratacije) sustava molekule i odgovarajućih aniona kvercetina s okolnim molekulama vode provedeno je za sve strukture prisutne na fiziološkom pH pri čemu su te strukture smještene u kvadar ispunjen molekulama vode u periodičkim uvjetima. Na takvom modelu, provedeni su računi molekulske dinamike u vremenu od 20 ns, a iz dobivenih trajektorija izračunati su prosječni reducirani gradijenti gustoće i termalni fluktuacijski indeksi. Vizualna prezentacija dobivenih rezultata omogućila je analizu prosječnih nekovalentnih interakcija molekula kvercetina s fluktuirajućom okolinom molekula vode pri čemu je utvrđeno da je solvatni kavez molekula otapala (vode) oko karbonilnih i OH skupina kvercetina vrlo čvrst, slabiji oko B prstena te najslabiji ispod i iznad ravnine A i C prstena te se može pretpostaviti da je na tome mjestu sterički olakšan pristup reaktivnom radikalu u antioksidativnoj reakciji kvercetina.

Računalno modeliranje sustava fragmenta U6 snRNA u vodi provedeno je za dvije različite konformacije koje se razlikuju u orijentaciji U80 koje su povezane s biološkom funkcijom tog fragmenta. Strukture su smještene u kvadar ispunjen molekulama vode u periodičkim uvjetima te su na takvom modelu provedeni računi molekulske dinamike u vremenu od 20 ns, a iz dobivenih trajektorija izračunati su prosječni reducirani gradijenti gustoće, termalni fluktuacijski indeksi te kvantno mehanički računi elektronske gustoće za reprezentativne strukture. Vizualna prezentacija dobivenih rezultata omogućila je detaljnu analizu prosječnih nekovalentnih interakcija baze U80 fragmenta U6 s fluktuirajućom okolinom koja uključuje ostale okolne baze, molekule vode i natrijeve ione tijekom procesa preklapanja u okviru reorganizacije konformacije fragmenta U6, pri čemu se utvrdilo da u cijelom procesu sudjeluju vodikove veze između baza i okolnih molekula vode te  $\pi$ -interakcije između baza.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 34 stranice, 17 grafičkih prikaza, 1 tablicu i 57 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: modeliranje, nekovalentne interakcije, kvercetin, U6, RNA

Mentor: **Dr. sc. Viktor Pilepić**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Viktor Pilepić**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Monika Barbarić**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Cvijeta Jakobušić Brala**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: srpanj 2019.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: pharmacy  
Department of Physical Chemistry  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### MODELLING OF NON-COVALENT INTERACTIONS IN THE PROCESSES OF QUERCETIN SOLVATION AND CONFORMATIONAL REORGANISATION OF A U6 snRNA FRAGMENT

Frano Mihaljević

#### SUMMARY

The research of non-covalent interactions was performed on two models of different biochemically and biomedically important systems: a system of quercetin molecule and the corresponding anions in a water solution and a system of the U6 fragment of snRNA in a water solution, by using molecular dynamic and quantum chemistry calculation methods.

Computer modelling of the solvation (hydration) of the system containing quercetin molecule with surrounding water molecules was performed for all of the quercetin structures present in physiological pH. The structures were placed in a box filled with water molecules. Molecular dynamics calculations were performed for a time of 20 ns in periodic boundary conditions. Values of average reduced density gradient and thermal fluctuation indices were calculated from the obtained trajectories. Visual presentation of calculated results enabled the analysis of the average non-covalent interactions of quercetin molecule with fluctuating environment made of water molecules. It was found that the solvent cages around carbonyl and OH functional groups are very tight, weak around the B ring and weaker above and below A and C ring planes. It can be assumed that the approach of the reactive radical in the antioxidative reaction of quercetin is sterically enabled around these areas.

Computer modelling of the U6 snRNA fragment system in water was performed for two different fragment conformations that differ in the orientation of U80 base. These conformations are related to the biological function of the fragment. Structures were placed in a box filled with water molecules. Molecular dynamics calculations were performed for a time of 20 ns in periodic boundary conditions. Visual presentation of calculated results enabled the analysis of the average non-covalent interactions of U80 base of the U6 RNA with the fluctuating environment that includes other nucleotides, water molecules and sodium ions during the process of U80 conformational switch. It was found that hydrogen bonds between base pairs, bases and surrounding water molecules, as well as  $\pi$ -interactions between bases are involved in the process.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 34 pages, 17 figures, 1 table and 57 references. Original is in Croatian language.

Keywords: modelling, non-covalent interactions, quercetin, U6, RNA

Mentor: **Viktor Pilepić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Viktor Pilepić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Monika Barbarić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Cvijeta Jakobušić Brala, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2019.